

1
MEMORIA DESCRIPTIVA

MÉTODO PARA LA INCORPORACIÓN DE ANTÍGENOS EN VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS Y FORMULACIONES RESULTANTES.

5

Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina, particularmente con el desarrollo de composiciones vacunales, de aplicación preventiva o terapéutica, que permiten un aumento en la calidad de la respuesta inmune contra
10 antígenos vacunales en enfermedades de origen diverso.

Estado de la técnica anterior

La tecnología del ADN recombinante ha traído grandes avances al campo de la investigación y el desarrollo de vacunas, al hacer posible la obtención de suficientes
15 cantidades de un gran grupo de antígenos de interés vacunal, lo que facilita la evaluación de su inmunogenicidad y su carácter protector. Sin embargo, en muchos casos estas proteínas se obtienen formando partes de cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión bacterianos son agregados de proteínas, mal renaturalizadas, que a menudo se forman en las bacterias recombinantes tras la
20 sobreexpresión de los genes clonados. En biotecnología, la formación de los cuerpos de inclusión representa un obstáculo importante para la producción de proteínas, ya que aún cuando favorecen los altos rendimientos, el recobrado *in vitro* de la proteína funcional de los depósitos insolubles depende de procedimientos de renaturalización técnicamente diversos y frecuentemente complejos (Carrio M.M., Villaverde A.
25 (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol.* 96:3-12).

Renaturalización de proteínas

Dentro de la última década se han desarrollado métodos y estrategias específicas
30 para preparar proteínas recombinantes activas a partir de estos cuerpos de inclusión. Generalmente, los cuerpos de inclusión pueden separarse fácilmente, solubilizarse con agentes desnaturalizantes, tales como cloruro de guanidio o urea, y entonces renaturalizarse a través de un proceso tal como la dilución o la diálisis. Avances recientes en los procesos de renaturalización incluyen la inhibición de la

agregación mediante la aplicación de aditivos de bajo peso molecular y renaturalización en matrices (Misawa S. and Kumagai I. (1999) Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers* 51:297-307).

- 5 Para purificar y renaturalizar la porina de membrana externa mitocondrial, canal aniónico dependiente de voltaje, en un solo paso se empleó la cromatografía de afinidad por iones metálicos, mediante un procedimiento en el que se extrae la proteína y la fracción soluble se aplica a la columna, en la cual se lavan los contaminantes en presencia de n-octilo-beta-D-glucopiranosido (OG) y glicerol y se
- 10 eluye la fracción que contiene la proteína de interés en presencia de OG e imidazol (Shi Y., et al. (2003) One-step on-column affinity refolding purification and functional analysis of recombinant human VDAC1. *Biochem Biophys Res Commun.* 303:475-82). En otro caso, se logró renaturalizar la proteína P2 de *Haemophilus influenzae*, que es una de las proteínas inmunogénicas mayoritarias de la membrana externa, en
- 15 una solución que incluía altas concentraciones salinas e iones de calcio (Pullen J.K., et al. (1995) Production of *Haemophilus influenzae* type-b porin in *Escherichia coli* and its folding into the trimeric form. *Gene* 152:85-8).

La proteína porina de *Rhodabacter capsulatus*, obtenida de forma natural, se modificó químicamente con metoxipolietilenglicol-succinimidil carbonato, para rendir

20 un conjugado soluble en agua de la misma. La renaturalización del conjugado se estudió mediante la adición secuencial de trifluoroetanol para bajar la constante dieléctrica, lo que no se logró. Se renaturalizó la proteína finalmente por adición de hexafluoro-2-propanol entre 5 y 10% (Wei J., Fasman G.D. (1995) A poly(ethylene glycol) water-soluble conjugate of porin: refolding to the native state. *Biochemistry*

25 34:6408-15).

Dos tipos de PorA, P1.6 y P1.7,16 del meningococo, se plegaron *in vitro* tras la sobreexpresión y el aislamiento partiendo de *E. coli*. Dichas porinas se plegaron eficientemente mediante dilución rápida en una solución tamponeada apropiada conteniendo el detergente n-dodecilo-N,N-dimetilo-1-amonio-3-propanosulfonato

30 (Jansen C., et al. (2000) Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of *Neisseria meningitidis*. *Biochim Biophys* 1464:284-98).

La inclusión en membranas formadas por bicapas lipídicas es una estrategia empleada en la renaturalización de proteínas porinas y otras proteínas integrales de

membrana, obtenidas por medio de la ingeniería genética. La principal proteína de membrana externa de *Chlamydia psittaci* y *Chlamydia pneumoniae*, se solubilizó a partir de cuerpos de inclusión usando 2% de OG y 1 mM de ditioneitol, antes de incorporarla a una bicapa lipídica (Wyllie S., et al. (1999) Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. *FEBS Lett* 445:192-96).

Las proteínas de la membrana externa de *Escherichia coli* OmpF y OmpA se renaturalizaron por dilución en una dispersión de vesículas lipídicas o vesículas detergente/lípido (Surrey T., et al. (1996). Folding and membrane insertion of the trimeric beta-barrel protein OmpF. *Biochemistry* 35: 2283-88).

El gen Opc del meningococo se clonó y expresó a altos niveles en *E. coli*. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad, se incorporó a liposomas y micelas del detergente Zwittergent. Para aumentar la respuesta inmune contra dicha proteína, se adicionó Mono Fosforil Lípido A (MFLA) a los liposomas y a las micelas, aumentando la magnitud de la respuesta y el rango de subclases de anticuerpos generados. La respuesta funcional más efectiva contra este antígeno se obtuvo en el caso de que la proteína se incorporó a liposomas con MFLA (Kolley K.A., et al. (2001) Immunization with Recombinant Opc Outer Membrane Protein from *Neisseria meningitidis*: Influence of Sequence Variation and Levels of Expression on the Bactericidal Immune Response against Meningococci. *Infect. Immun.* 69:3809-16).

Las proteínas porinas PorA y PorB de *N. meningitidis*, obtenidas en dos hospederos recombinantes, se han renaturalizado empleando este mismo enfoque, consistente en la incorporación a liposomas formados por fosfolípidos y colesterol, en presencia o no de detergentes.

El gen *porA* de *N. meningitidis* se clonó y expresó en *E. coli*. La proteína purificada por afinidad se adyuvó con el adyuvante Al(OH)₃, o se presentó en liposomas. La inmunización de la proteína recombinante en liposomas indujo anticuerpos con gran avidez por la proteína nativa, que reaccionaron con el meningococo intacto e inhibieron la unión de anticuerpos protectores (Christodoulides M., et al. (1998) Immunization with recombinant class 1 outer-membrane protein from *Neisseria meningitidis*: influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. *Microbiology* 144:3027-37).

El gen *porB* de una cepa de *N. meningitidis* que expresa la proteína PorB3 se clonó e insertó en el vector pRSETB y la proteína se expresó a altos niveles en el hospedero *E. coli*. La proteína recombinante se purificó hasta homogeneidad mediante cromatografía de afinidad y se usó para la inmunización después de la
5 incorporación a liposomas y a micelas del detergente Zwittergent o la sulfobetaina. El suero producido por los liposomas y las micelas mostró mayor reactividad con la proteína nativa (Wright J.C., et al (2002). Immunization with the Recombinant PorB Outer Membrane Protein Induces a Bactericidal Immune Response against *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 70:4028-34).

10

Neisseria meningitidis, vesículas y proteínas de membrana externa

Neisseria meningitidis, un diplococo Gram negativo cuyo único hospedero es el hombre, es el agente causal de la meningitis meningocócica. Usualmente esta bacteria se encuentra en estado de portador asintomático en la población, siendo
15 esta la vía más común para su aislamiento microbiológico. Diversas estrategias se han desarrollado con el objetivo de obtener un preparado vacunal que satisfaga los requisitos necesarios para proteger a la población contra esta enfermedad. Para ello se han tenido en cuenta los antígenos capsulares cuya especificidad inmunológica ha permitido la clasificación de este microorganismo en serogrupos. El serogrupo B,
20 a diferencia del resto, continúa siendo una importante causa de enfermedad meningocócica endémica y epidémica, en gran parte debido a la no existencia de vacunas efectivas contra el mismo. Producto de la baja inmunogenicidad del polisacárido del serogrupo B (Finne J., et al. (1987) An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid
25 units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J. Immunol.* 138:4402-07), el desarrollo de vacunas contra este serogrupo se ha concentrado en el uso de antígenos subcapsulares.

En la década de los años 70 la producción de vacunas de proteínas de membrana externa (PME), estuvo basada en la eliminación del lipopolisacárido (LPS) de las
30 preparaciones proteicas mediante la utilización de detergentes (Frasch C.E., Robbins J.D. (1978) Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model. *J. Exp. Med.* 147(3):629-44). Después, las PME fueron precipitadas para producir agregados resuspendidos en cloruro de sodio. A pesar de los buenos resultados obtenidos en estudios realizados en animales, estas

vacunas no indujeron anticuerpos bactericidas ni en adultos ni en niños (Zollinger W.D., et al. (1978) Safety and immunogenicity of a *Neisseria meningitidis* type 2 protein vaccine in animals and humans. *J. Infect. Dis.* 137(6):728-39), resultado que fue atribuido a la desnaturalización de las proteínas presentes en la preparación como resultado de la precipitación. Los siguientes pasos en la búsqueda de un nuevo candidato, se encaminaron al diseño de una vacuna que presentara las proteínas en su conformación nativa, formando vesículas de membrana externa (VME) (Zollinger W.D., et al. (1979) Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. *J. Clin. Invest.* 63(5):836-48; Wang L.Y. and Frasch C.E. (1984) Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect. Immun.* 46(2):408-14).

Las vacunas compuestas por VME fueron significativamente más inmunogénicas por vía parenteral que los agregados de PME y esta inmunogenicidad fue explicada inicialmente por una mayor adsorción al adyuvante hidróxido de aluminio (Wang L.Y. and Frasch C.E. (1984) Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect. Immun.* 46(2):408-14). Posteriormente, la efectividad de las vacunas de VME se ha atribuido a la presentación de las PME, dispuestas en su conformación natural, para permitir la generación de anticuerpos bactericidas, al menos en adolescentes y adultos. Las respuestas de anticuerpos generadas, incrementaron la opsonofagocitosis del meningococo. La formulación precisa de las vacunas (por ejemplo: contenido de PME, contenido de LPS y la presencia o ausencia del adyuvante) tiene un significativo impacto en la inmunogenicidad existiendo grandes diferencias de un productor a otro según la cepa y/o la metodología empleada (Lehmann A.K., et al. (1991) Immunization against serogroup B meningococci. Opsonin response in vaccinees as measured by chemiluminescence. *APMIS* 99(8):769-72; Gomez J.A., et al. (1998) Effect of adjuvants in the isotypes and bactericidal activity of antibodies against the transferrin-binding proteins of *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 16(17):1633-39; Steeghs L., et al. (1999) Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. *Infect. Immun.* 67(10):4988-93).

Dentro de las proteínas más estudiadas del meningococo están las porinas. La porina PorA, de aproximadamente 42 kDa, ha mostrado por análisis de secuencia

que su variabilidad está concentrada exclusivamente en dos de los 8 lazos expuestos de la proteína (VR1 y VR2). La variación de estas regiones ha sido usada en el subtipaje de las cepas del meningococo (Abdillahi H. and Poolman J.T. (1988) *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. *Microb. Pathog.* 4:27-32). Con la construcción de péptidos sintéticos y el uso de anticuerpos monoclonales se ha logrado comprobar que los epítomos inmunodominantes están siempre localizados en estas regiones (McGuinness B., Lambden P.R. and Heckels J.E. (1993) Class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: epitope analysis of the antigenic diversity between strains, implications for subtype definition and molecular epidemiology. *Mol. Microbiol.* 7:505-514).

Aunque estos epítomos son lineales, cuando estas proteínas son clonadas y expresadas en *E. coli* (Niebla O. (2001) Immunogenicity of recombinant class 1 protein from *Neisseria meningitidis* refolded into phospholipid vesicles and detergent. *Vaccine* 19:3568-74) u otra cepa heteróloga, como *Bacillus subtilis* (Nurminen M., et al. (1992) The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* produced in *Bacillus subtilis* can give rise to protective immunity. *Mol. Microbiol.* 6:2499-2506), el proceso de renaturalización de las mismas juega un papel definitorio en la respuesta, ya que la capacidad de inducir anticuerpos con actividad bactericida y protectora contra los epítomos inmunodominantes puede ser anulada si el antígeno no es presentado satisfactoriamente al sistema inmune. Por lo tanto, esto último explica en parte la necesidad de que se alcance una adecuada renaturalización de determinados antígenos, lo cual constituye un importante problema al cual se le busca solución.

25 Explicación de la Invención

La presente invención resuelve el problema antes mencionado, proporcionando un método para incorporar antígenos en proteoliposomas, donde dichos antígenos forman un complejo con una preparación de proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas, siendo este complejo generado por co-renaturalización y mantiene intacta la estructura vesicular del proteoliposoma.

En una realización preferida, el método incluye una preparación de proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas, obtenida a partir de especies de la familia *Neisseriaceae* o de *Bramhamella catarrhalis*, siendo especialmente preferidas las que incluyen *Neisseria meningitidis* y *Neisseria lactamica*.

En otra materialización de la invención, el antígeno proteico que forma parte del complejo es de origen natural, recombinante o sintético.

Igualmente la invención se refiere a la combinación vacunal derivada a partir del método descrito anteriormente y que comprende un complejo formado por una
5 preparación de proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas, elaborada a partir de especies de la familia Neisseriaceae o de *Bramhamella catarrhalis*, y un antígeno proteico de origen natural, recombinante o sintético, donde este complejo es generado por co-renaturalización y mantiene intacta la estructura vesicular del proteoliposoma. Dependiendo de las circunstancias, las
10 composiciones vacunales pueden administrarse por vía parenteral o mucosal.

Un aspecto particularmente importante de la invención relaciona la adición a las composiciones vacunales antes mencionadas de polisacáridos bacterianos, de polisacáridos bacterianos conjugados y de ácidos nucleicos como antígenos.

También es parte de la presente invención el uso profiláctico o terapéutico de las
15 combinaciones anteriormente descritas en humanos.

En estas composiciones, los antígenos proteicos se renaturalizan mediante la inserción en vesículas proteoliposomales, para lograr el correcto plegamiento de los mismos. Dichas composiciones tienen nuevas propiedades que resultan de la generación del complejo, que se origina de forma tal que se mantiene intacta la
20 estructura vesicular.

La administración mucosal de dichas composiciones puede generar una respuesta inmune sistémica de similar intensidad y superior calidad a la que se obtiene con formulaciones vacunales convencionales que usan alúmina como adyuvante. Además, la inmunización por esta ruta es capaz de generar una potente respuesta a
25 nivel de mucosas, caracterizada por altos niveles de anticuerpos de tipo IgA.

La incorporación de PorA recombinante al proteoliposoma del meningococo, aumenta el espectro protector de las preparaciones de vesículas de membrana externa, a la vez que facilita el proceso de renaturalización de dicho antígeno recombinante, permitiendo la generación de anticuerpos subtipo específicos
30 capaces de producir la lisis mediada por complemento, lo que conlleva a la destrucción de la bacteria.

La presente invención, en contraste al estado de la técnica anterior, es útil para alcanzar la adecuada renaturalización de antígenos de carácter proteico sin que tengan que ser incluidos en bicapas lipídicas artificiales, modificados químicamente

o mezclados con compuestos químicos de origen inorgánico. Mediante dicha invención se obtiene una respuesta inmune funcional más efectiva, en términos de calidad de los anticuerpos que se generan contra el antígeno de interés, debido a la óptima presentación del mismo al sistema inmune.

5

Breve descripción de los dibujos

En parte, los resultados se muestran gráficamente en las siguientes figuras:

Figura 1: Protección pasiva contra la infección meningocócica, determinada en el modelo de ratas infantiles. Las ratas recibieron los antisueros obtenidos al inmunizar
10 ratones con: 1. proteoliposoma con estructura vesicular, 2. proteoliposoma con estructura no vesicular. Como Control negativo (C-) se empleó suero de ratones no inmunizados y como Control positivo (C+) un suero hiperinmune de ratón inmunizado con PME por ruta intraperitoneal.

15 Figura 2: Purificación de PorA recombinante. A: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Línea 1: patrón de peso molecular de proteína. Línea 2: Muestra inicial de la purificación, fracción después de ruptura por ultrasonido. Línea 3: Muestra final, fracción eluída de intercambio iónico. B: Cromatograma de la densitometría de la fracción cromatográfica de intercambio iónico.

20

Figura 3: Análisis electroforético de las variantes de incorporación. A. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Línea 1: Patrón de peso molecular. Línea 2: Proteína recombinante. Línea 3,4,5,6,7: variantes de incorporación. Línea 8: VME.
B: Inmunoidentificación por Western blot de la proteína incorporada, realizada con el
25 anticuerpo monoclonal anti P1.16. Línea 1: Patrón de peso molecular. Línea 2: VME. Línea 3,4,5,6,7: variantes de incorporación. Línea 8: proteína recombinante.

Figura 4. Fotos de Microscopía electrónica evidenciando la inserción de la proteína recombinante PorA 7,16,9. A: Vesículas de membrana externa evidenciadas por tinción negativa y microscopía electrónica, Cepa CU385. B: Vesículas de membrana
30 externa marcadas inmunológicamente utilizando un anticuerpo monoclonal anti PorA (Subtipo 15). C: Vesículas de membrana externa marcadas inmunológicamente utilizando un monoclonal anti PorA subtipo 16.

Figura 5. Western blot para verificar incorporación de la proteína recombinante bajo diferentes condiciones. **A:** proteína recombinante P1. 7,16,9 detectada con Mab 1-33, anti-P1.9. **B:** P1 natural presente en la vesícula. Línea 1: Proteoliposoma natural. Línea 2: Proteína recombinante purificada. Línea 3,4,5,6: variantes de incorporación.

Figura 6. Representación gráfica de los títulos de anticuerpos IgG contra la proteína recombinante P1.7,16,9, alcanzados por los diferentes grupos de animales inmunizados. 1: Con P1.9 recombinante, 2: P1.16 recombinante, 3: P1.7,16 recombinante, 4: P1.7,16,9 recombinante. El título fue determinado como el recíproco de la máxima dilución que triplica el valor de D.O del suero preinmune.

Figura 7. Representación gráfica de los títulos individuales de anticuerpos IgG contra las porinas de *Neisseria* inducidos cuando se inmunizó con la proteína recombinante P1.7,16,9. El título fue determinado como el recíproco de la máxima dilución que triplica el valor de D.O del suero preinmune.

Figura 8. Representación gráfica de los títulos de anticuerpos bactericida al evaluar el suero obtenido inmunizando con la proteína recombinante P1.7,16,9, contra cepas de *Neisseria* de los subtipos 7, 16, y 9. El título fue determinado como el recíproco de la máxima dilución del suero donde se obtiene más del 50% de muerte.

Figura 9. Representación gráfica de los títulos de anticuerpos contra la proteína TbpB recombinante en las diferentes variantes de renaturalización estudiadas. **A-** Evaluación contra la proteína recombinante. **B-** Evaluación contra la proteína natural en las membranas de la cepa B16B6. El título fue determinado como el recíproco de la máxima dilución que duplica el valor de D.O del suero preinmune.

Figura 10. Resultados del ensayo de inhibición de la unión a transferrina en presencia de los anticuerpos séricos para las variantes estudiadas. El título fue determinado como el recíproco de la máxima dilución del suero donde se alcanza más del 40% de inhibición.

Figura 11. Representación gráfica de los títulos de anticuerpos al evaluar el suero obtenido inmunizando con las diferentes variantes, contra las cepas de *Neisseria* de subtipo P1.16. El título fue determinado como el recíproco de la máxima dilución que duplica el valor de D.O del suero preinmune.

5

Figura 12. Niveles de anticuerpos anti-péptido VR2 inducidos mediante la inmunización con MAP de la VR2 de la proteína PorA del meningococo. Como antígeno de recubrimiento se empleó un conjugado químico del péptido que cubre dicha región y seroalbúmina bovina.

10

Figura 13. Representación gráfica de los títulos de anticuerpos contra VME de una cepa de *Neisseria* de subtipo P1.16, obtenidos al evaluar los antisueros producidos inmunizando con P1.16 recombinante, con la misma proteína incorporada en VME de *Neisseria lactamica* o *Branhamella catarrhalis*, o con las VME correspondientes.

15 El título fue determinado como el recíproco de la máxima dilución que duplica el valor de densidad óptica del suero preinmune.

Figura 14. Representación gráfica de los títulos de anticuerpos contra TbpB recombinante (A) y P6 recombinante (B), obtenidos al evaluar los antisueros producidos inmunizando con: TbpB, TbpB-VME de la cepa CU385 (TbpB-V), VME de la cepa CU385 (V), TbpB-VME de la cepa CU385 formulado junto a pELIP6 (TbpB-V,pELIP6) y TbpB-VME de la cepa CU385 formulado junto a pELI (TbpB-V,pELI). El título fue determinado como el recíproco de la máxima dilución que duplica el valor de densidad óptica del suero preinmune.

25

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos

La presente invención será descrita más completamente mediante los ejemplos siguientes, los cuales son ilustrativos y no limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Influencia de la estructura vesicular del proteoliposoma de *Neisseria meningitidis*, administrado por ruta intranasal, en su inmunogenicidad y capacidad protectora.

30

Se realizó un estudio comparativo de la inmunogenicidad del proteoliposoma con estructura vesicular (PV) y no vesicular (PNV), mediante el siguiente experimento. Se analizaron 2 grupos, de 10 ratones cada uno, inmunizados por vía intranasal.

Los animales recibieron 3 dosis separadas por 7 días, con 50µg de proteoliposoma en la estructura que se indica, según el grupo. El volumen fue de 50µl por animal. La composición de los grupos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del inmunógeno empleado por grupo

Grupo	PV	PNV
1	50µg	---
2	--	50µg

Los niveles de IgG específicos contra las PME de la cepa CU385 de *N. meningitidis*, después de segunda y tercera dosis, se determinaron por ELISA. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 2. Los títulos de anticuerpos se determinaron como el recíproco de la dilución del suero que triplica el valor del suero preinmune.

El análisis estadístico de los resultados se realizó a través de una prueba *t* de Student.

Tabla 2. Resultados obtenidos al evaluar los sueros policlonales por ELISA y ensayo bactericida.

Grupo	Anticuerpos contra PME cepa CU385		Actividad funcional
	Título (2 ^{da} dosis)	Título (3 ^{ra} dosis)	Título Bactericida
1	3447	25600	1024
2	2395	5855	32

Después de la tercera dosis existe una diferencia significativa entre los niveles de anticuerpos del grupo inmunizado con proteoliposoma que presenta estructura vesicular, respecto al grupo que no la presenta, por lo que se evidencia la ventaja del mantenimiento de la estructura vesicular en la respuesta de anticuerpos generada después de la inmunización por vía intranasal. Además los resultados se reafirman a través de la determinación del título de anticuerpos bactericidas, también presentados en la Tabla 2 y el experimento de protección pasiva en el modelo de infección meningocócica en ratas infantiles (Figura 1). El título bactericida se determinó como el recíproco de la máxima dilución del suero donde se obtiene más del 50% de muerte del inóculo bacteriano. En ambos ensayos se

demuestra que la actividad funcional de los antisueros obtenidos contra el proteoliposoma presentado en su estructura vesicular es superior a la actividad funcional de los antisueros contra el proteoliposoma no vesicular.

5 Ejemplo 2: Obtención de la proteína recombinante PorA e inserción de la misma en el proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* manteniendo intacta la estructura vesicular.

Obtención de la proteína recombinante PorA 7,16,9

Mediante ingeniería genética se obtuvo una proteína PorA recombinante que
10 contiene epítopos pertenecientes a los subtipos P1.7,16 y P1.9, en un mismo polipéptido. El clon de *E. coli* que expresa el gen codificante para dicha proteína recombinante se creció en medio líquido LBA durante 8 horas a 37°C, en presencia de kanamicina. Después de la centrifugación, el precipitado celular fue sujeto a
15 se sometió a las siguientes manipulaciones:

-Lavados del sedimento con el tampón Tris-EDTA, pH 8,0 (TE), y después al mismo tampón se le adiciona: NaCl 0.1M, MgCl 0.8M, 0.5% NP40.

-Solubilización de la proteína recombinante con una solución que contiene Urea 8M disuelta en el tampón carbonato-bicarbonato pH 10,0 a una concentración final de
20 10 mg/ml.

Finalmente se procedió a la purificación de la proteína por métodos cromatográficos. Después de la extracción de la proteína recombinante a 10 mg/ml, esta se diluye en tampón TE para llevar la Urea a 4M y se somete a un proceso de filtración en gel de intercambio iónico en Q-Sepharosa.

25 La pureza de la proteína resultante se muestra en la Figura 2.

Inserción de la proteína recombinante PorA 7,16,9 en el proteoliposoma

Con el objetivo de encontrar las condiciones de inserción/renaturalización de la proteína en el proteoliposoma se ensayaron 6 variantes diferentes. En la variante II la incorporación de la proteína se realizó mediante la mezcla con el preparado de
30 proteínas de membrana externa 1:1 en Tris-HCl 1M con 2mM de EDTA, 1.2% de Desoxicolato de sodio y 20% de sacarosa (solución B), y posteriormente la mezcla es centrifugada. La variante III mantuvo las mismas condiciones que la variante II, pero con una relación proteína recombinante-PME 2:1. En la variante IV la proteína fue incubada después de la mezcla 1,5 h a temperatura ambiente antes de

centrifugar. En las variantes V y VI la proteína recombinante fue renaturalizada por dilución en la solución B, luego se mezcla con las PME y se centrifuga a 125 000g. La incorporación de la proteína recombinante en las vesículas fue evidenciada inicialmente por análisis electroforético de las variantes estudiadas. La presencia de una banda de proteína con la misma talla que la proteína recombinante en algunas de las variantes constituyó una evidencia de la incorporación obtenida. Esto se corroboró en la inmunoidentificación de la banda con el anticuerpo monoclonal anti-P1.16, señal que aparece indicada con la flecha superior en la Figura 3B.

En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de incorporación determinado por un ELISA de captura empleando el anticuerpo monoclonal anti-P1.9 y el anticuerpo anti N-terminal de la P64k conjugado a peroxidasa. Este segmento de la proteína P64k de *N. meningitidis* aparece expresado en el extremo N-terminal de la proteína recombinante P1.7,16,9, como segmento estabilizador, lo que permite emplearlo a su vez en la inmunodetección.

Tabla No. 3 Porcentaje de incorporación obtenido para las variantes estudiadas

Variante N°	Proteliposoma	Proteína _{rec}	Renaturalización	% de* incorporación
I	5µg	-	-	-
II	5µg	5µg	mezcla, ultracentrifugación	17
III	5µg	10µg	mezcla, ultracentrifugación	19.6
IV	5µg	10µg	mezcla 1.30', ultracentrifugación	18
V	5µg	10µg	renaturalización por dilución, mezcla, ultracentrifugación	8
VI	5µg	5µg	renaturalización por dilución, mezcla, ultracentrifugación	14

Al emplear distintos métodos para medir la incorporación de la proteína recombinante en el proteoliposoma se detectan algunas diferencias entre los procedimientos de incorporación. Estas diferencias pueden atribuirse más a la naturaleza del método de detección que a divergencias entre los procedimientos, ya que los resultados de la evaluación inmunológica así lo indican. A pesar de las

diferencias observadas por electroforesis y Western blot entre los diferentes métodos de incorporación, cuando los sueros de los animales inmunizados con estas variantes fueron evaluados por ELISA esas diferencias no fueron significativas.

- 5 Todas las variantes de renaturalización fueron analizadas mediante inmunomicroscopía electrónica. Los resultados obtenidos con las diferentes variantes estuvieron en correspondencia con el ELISA de cuantificación. La Figura 4 A, B y C muestra los resultados para la variante IV.

10 Como se aprecia la presencia de la proteína recombinante se evidencia por la unión de las partículas de oro coloidal conjugado con el correspondiente anticuerpo monoclonal. En todos los casos se evidencia también el mantenimiento de la estructura vesicular a pesar de las manipulaciones realizadas.

Ejemplo 3: Evaluación de la respuesta inmune obtenida contra la proteína recombinante PorA insertada en el proteoliposoma de *Neisseria meningitidis*.

15 Una vez seleccionada una variante de incorporación de la proteína recombinante P1.7,16,9, se procedió a la inserción de las proteínas recombinantes P1.9, P1.16 y P1.7,16 en el proteoliposoma. Dichas preparaciones se utilizaron como control en un esquema de inmunización con el objetivo de evaluar la respuesta inmune generada contra la proteína P1.7,16,9. Estos antígenos se clonaron y expresaron en *E. coli*, a partir del genoma de cepas de *N. meningitidis*, que expresan epitopos correspondientes a dichos subtipos, dada la variabilidad que presenta la proteína PorA o P1, como se le conoce indistintamente.

20 Las proteínas fueron renaturalizadas mediante dilución en Tris-HCl 1M con 2mM de EDTA, 1.2% de Desoxicolato de sodio y 20% de sacarosa, e incubadas con el preparado de proteínas de membrana externa 1.5 h a temperatura ambiente antes de la centrifugación. Este fue el método seleccionado en lo adelante para la incorporación de antígenos proteicos en la membrana externa de bacterias gram negativas.

30 Para verificar la incorporación de las proteínas recombinantes en el proteoliposoma, se realizaron experimentos de inmunoidentificación por Western blotting, con anticuerpos monoclonales específicos para esos subtipos. La Figura 5 muestra el resultado de la inmunoidentificación realizada con el anticuerpo monoclonal 1-33

que reconoce P1.9, la cual evidenció la incorporación de las proteínas recombinantes P1.9 y P1.7,16,9.

Para evaluar la inmunogenicidad de la proteína incorporada, se emplearon 40 ratones Balb/C hembras, de 8 a 10 semanas de edad, los cuales fueron divididos en cuatro grupos de 10 animales cada uno. Se realizaron tres inmunizaciones por vía subcutánea, separadas por intervalos de una semana y las extracciones de sangre se efectuaron el mismo día y una semana después de la tercera inoculación. Las proteínas se adyuvan con hidróxido de aluminio a una concentración de 40 µg/µg de proteína.

10 **Tabla No. 4 Composición del inmunógeno empleado por grupo.**

Grupo	VME cepa CU385	Proteína recombinante
1	5µg	10µg (P1.9)
2	5µg	10µg (P1.16)
3	5µg	10µg (P1.7,16)
4	5µg	10µg (P17,16,9)

Después de la tercera inoculación, se determinó por ELISA el título de anticuerpos (IgG) contra la proteína recombinante P1.7,16,9, en los sueros. Así mismo, se evaluó el reconocimiento de los antígenos correspondientes presentes en preparaciones de PME de cepas de *N. meningitidis* que expresan los subtipos de P1 antes mencionados, por los antisueros resultantes del esquema de inmunización descrito.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el método no paramétrico de análisis de varianza, de clasificación simple por rangos, de Kruskal-Wallis, debido a que las varianzas entre los grupos no eran homogéneas, según la prueba de Bartlett. En la comparación de las medias de los tratamientos en las combinaciones necesarias se realizó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

La Figura 6 representa gráficamente los resultados del esquema de inmunización, en cuanto a niveles de anticuerpos contra la proteína recombinante P1.7,16,9. Este ensayo se realizó utilizando una mezcla de los sueros individuales por grupo. Como se observa, la inmunización con cada una de las cuatro proteínas recombinantes incorporadas en los proteoliposomas indujo anticuerpos contra la proteína

química, que incluye todos los subtipos de P1 en estudio. Los mayores niveles de anticuerpos contra dicha proteína se indujeron tras la inmunización con el propio antígeno.

Al evaluar el reconocimiento de los antígenos naturales presentes en las distintas cepas de *N. meningitidis*, se observó que los sueros reaccionaron con las proteínas P1 de los subtipos correspondientes. Muestra de ello son los resultados que se representan en la Figura 7. Los sueros individuales de los ratones inmunizados con proteína recombinante P1.7,16,9 (insertada en el proteoliposoma) reconocieron las VME de cepas de meningococos que expresan P1.7, P1.9, P1.16 y P1.7,16.

Para determinar si estos antisueros poseían actividad funcional contra *N. meningitidis* se realizó un experimento de lisis mediada por complemento, conocido como ensayo bactericida. En la Figura 8 se muestran los títulos de anticuerpos bactericidas obtenidos contra cepas que expresan P1.9, P1.16, P1.7, y P1.7,16, respectivamente. Como se aprecia, los anticuerpos obtenidos inmunizando con P1.7,16,9 renaturalizada en el proteoliposoma de la cepa CU385, tuvieron actividad bactericida contra todas las cepas heterólogas que contenían los subtipos en ella incluidos.

Ejemplo 4: Inserción de la proteína TbpB en el proteoliposoma. Obtención y evaluación de un complejo PorA-TbpB-VMC por co-renaturalización, y evaluación de la respuesta inmune contra el mismo.

La proteína TbpB es una proteína receptora de transferrina humana que es expresada por *N. meningitidis* y constituye un antígeno de interés vacunal. Los rasgos antigénicos de la proteína TbpB hacen que las cepas de *N. meningitidis* se clasifiquen en dos familias principales: isotipo I e isotipo II, los que se diferencian de acuerdo a la masa molecular de dicha proteína.

La proteína TbpB correspondiente a la cepa B16B6 se clonó y expresó en *E. coli*. A partir de la biomasa obtenida, se purificó la proteína recombinante hasta homogeneidad empleando procedimientos cromatográficos ampliamente descritos. Con el objetivo de lograr la renaturalización de esta TbpB recombinante, perteneciente al isotipo I, se empleó proteoliposoma obtenido a partir de la cepa CU385, que expresa una TbpB que pertenece al otro isotipo, por lo que ambas TbpB se diferencian antigénicamente.

Para la renaturalización de la proteína TbpB recombinante, ésta se incubó con el proteoliposoma durante 4h a 37°C, o se incubó durante 4h con PorA recombinante (P1.16) y el proteoliposoma a 37°C y en una tercera variante se incubó por 1h a 4°C con la mezcla P1.16 y proteoliposoma, previamente incubados por 4h a 37°C. En todas las variantes las preparaciones fueron finalmente centrifugadas a 125 000g. Para la evaluación de la respuesta inmune, se inmunizaron 50 ratones Balb/C hembras de 8 a 10 semanas, divididos en 5 grupos (de 10 animales cada uno), que se inmunizaron con los inmunógenos que describe la Tabla 5.

Tabla No. 5 Composición del inmunógeno por grupo

Grupo	VME cepa CU385	Proteína recombinante
1	5µg	10µg-TbpB, 4h a 37°C
2	5µg	10µg-P1.16, 4h a 37°C
3	5µg	10µg-(P1.16 y TbpB, 4h a 37°C)
4	5µg	10µg-(P1.16, 4h a 37°C + TbpB, 1h a 4°C)
5	-	10µg-TbpB

Se realizaron tres inmunizaciones por vía subcutánea, separadas por intervalos de una semana y las extracciones de sangre se efectuaron el mismo día y por último una semana después de la tercera inoculación. Las proteínas se adyuvaron con hidróxido de aluminio a una concentración de 40 µg/µg de proteína.

En la Figura 9 se representan los resultados de la evaluación de los títulos de anticuerpos generados. La determinación de dichos títulos se realizó por ELISA, utilizando como antígeno de recubrimiento la proteína recombinante y las VME de la cepa B16B6, a partir de la cual se realizó el clonaje de TbpB.

El ELISA contra la proteína recombinante evidenció la especificidad de la respuesta de anticuerpos para todas las variantes estudiadas (Figura 9A). Cuando la proteína TbpB, renaturalizada con el preparado de membrana externa de *Neisseria*, no es expuesta a la incubación a 37°C, los anticuerpos obtenidos reconocen a la proteína presentada en las VME de la bacteria (Figura 9B).

Los anticuerpos contra la proteína TbpB tienen la capacidad de bloquear la unión entre la transferrina y la TbpB presente en las membranas de meningococo. Los

- sueros obtenidos contra la proteína TbpB recombinante, insertada en el proteoliposoma de otra cepa, se estudiaron en el ensayo de inhibición de la unión a transferrina. Los resultados de dicho estudio se muestran en la Figura 10. Las diferencias significativas observadas para los títulos de anticuerpos contra la proteína TbpB natural no se reflejaron en los títulos de inhibición de la unión a transferrina, cuando la proteína era incubada con los sueros hiperinmunes de ratón. En todas las variantes en que la proteína se renaturalizó con el proteoliposoma se observó inhibición de la unión de la transferrina a la proteína receptora presente en las PME del meningococo.
- 10 La combinación de TbpB con PorA recombinante (subtipo P1.16), insertadas ambas en el proteoliposoma de una cepa heteróloga, no afectó la inmunogenicidad de PorA en el complejo PorA-TbpB-VME cuando son incubadas a 4°C (Figura 11).

Ejemplo 5: Evaluación de la respuesta inmune obtenida contra un péptido sintético insertado en el proteoliposoma de *Neisseria meningitidis*.

- Con vistas a lograr una mayor inmunogenicidad, por vía mucosal, de un péptido multiepitópico (del inglés *Multiple Antigen Peptide*, MAP) que contenía la región variable 2 (VR2) (Garay, H.E *et al.* (2000) Disulfide bond polymerization of a cyclic peptide derived from the surface loop 4 of class 1 OMP of *Neisseria meningitidis*. *Lett. Pept. Sci.* 7:97-105) de la porina PorA de *N. meningitidis* presente en la cepa CU385 (subtipo 15) éste se incorporó a VME de una cepa heretóloga de *N. meningitidis* (233) de clasificación C:2a:P1.5 (subtipo 5). Esta combinación antigénica fue administrada a cada ratón ($n=8$), por vía intranasal, en un esquema de tres dosis, separadas entre sí por intervalos de 14 días. Los grupos inmunizados se reflejan en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición del inmunógeno por grupo

Grupo	MAP	VME
1	50 µg	-
2	50 µg	10 µg
3	-	10 µg

- Quince días después de dos y tres dosis se muestrearon los animales para obtener el suero. El título de anticuerpos contra la VR2 de la porina en estudio se determinó mediante un ensayo tipo ELISA contra el péptido sintético que cubría la región VR2, conjugado a la seroalbúmina bovina. Los resultados obtenidos por ELISA, medidos en el suero colectado dos semanas después de dos dosis, se muestran en la Figura 12. Como se observa existió un mayor título de anticuerpos contra el péptido (con significación estadística) cuando el péptido se coadministró con VME. Dichas VME, por ser de una cepa heteróloga, son incapaces de inducir anticuerpos contra este péptido (grupo 3).
- Además, se realizaron experimentos de Inmunoblot en el que se separaron electroforéticamente 10µg de VME de la cepa CU385 por línea, que una vez transferidas a membranas de nitrocelulosa se incubaron con la mezcla de los sueros de cada grupo. En el suero obtenido dos semanas después de la tercera dosis se apreció un mayor reconocimiento de la proteína PorA (subtipo 15), por el suero del grupo 2 comparado con el grupo 1, lo cual indica que el reconocimiento de la proteína parental se favoreció al incorporar el MAP a las VME de una cepa de diferente subtipo.

Ejemplo 6: Evaluación de la respuesta inmune obtenida contra la proteína recombinante PorA insertada en proteoliposomas de *Neisseria lactamica* y *Bramhamella catarrhalis*

A partir de otros microorganismos Gram negativos, *Neisseria lactamica* y *Bramhamella catarrhalis*, se obtuvieron preparaciones de VME que se emplearon para renaturalizar la proteína PorA recombinante del subtipo P1.16, siguiendo los procedimientos antes descritos.

Para verificar la inmunogenicidad de la proteína recombinante incorporada a ambos proteoliposomas, se emplearon 50 ratones Balb/C hembra, de 8 a 10 semanas de edad, los cuales fueron divididos en cinco grupos (de 10 animales cada uno), según se muestra en la Tabla 7. Se realizaron tres inmunizaciones por vía subcutánea, separadas por intervalos de 15 días y las extracciones de sangre se efectuaron el mismo día y una semana después de la tercera inoculación. Las proteínas se adyuvan con hidróxido de aluminio a una concentración de 40 µg/µg de proteína.

Tabla 7. Composición del inmunógeno empleado por grupo.

Grupo	VME <i>N. lactamica</i>	VME <i>B. catarrhalis</i>	P1.16 rec.
1			10µg
2	5µg		10µg
3		5µg	10µg
4	5µg		
5		5µg	

Después de la tercera inoculación, se determinó en los sueros el título de anticuerpos (IgG) contra la proteína P1.16 recombinante y contra la porina parental presente en PME de meningococos, por ELISA. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un análisis de varianza de clasificación simple. En la comparación de las medias de los tratamientos en las combinaciones necesarias se realizó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

La Figura 13 representa gráficamente los resultados del esquema de inmunización, en cuanto a niveles de anticuerpos contra la proteína P1.16 presente en VME de meningococos. La proteína recombinante adyuvada con alúmina no fue capaz de inducir anticuerpos que reconocieran la porina de subtipo 16 nativa. Los mayores títulos de anticuerpos contra dicha porina nativa se indujeron tras la inmunización con el antígeno incorporado en las VME de *N. lactamica*, seguido por el antígeno incorporado en VME de *B. catarrhalis*. Existieron diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos generados tras la inmunización con la proteína recombinante incorporada y los títulos de anticuerpos inducidos por la inmunización con VME de estos dos microorganismos Gram negativos, por sí solas.

Ejemplo 7: Evaluación de la respuesta inmune inducida por una formulación compuesta por TbpB recombinante, incorporada en el proteoliposoma de CU385, y un vector para inmunización con ADN.

Se construyó un plasmidio que porta el gen que codifica para la proteína P6 de *Haemophilus influenzae*, el que se denominó pELIP6 y se empleó en experimentos de inmunización con ADN. Se purificó el material necesario para incluir dicho plasmidio en formulaciones que contenían la proteína TbpB recombinante (B16B6)

insertada en el proteoliposoma de la cepa de *N. meningitidis* CU385. Como control se obtuvo el vector pELI, similar al plasmidio pELIP6 pero que carece del segmento codificante para la P6.

Para verificar la inmunogenicidad de las formulaciones se emplearon 40 ratones Balb/C hembra, de 8 a 10 semanas de edad, los cuales se dividieron en cinco grupos (de 8 animales cada uno), según se muestra en la Tabla 8. Se realizaron cuatro inmunizaciones por vía subcutánea, separadas por intervalos de 21 días y las extracciones de sangre se efectuaron el día de inicio del esquema y tres semanas después de la cuarta inoculación. Las proteínas se adyuvan con hidróxido de aluminio a una concentración de 40 µg/µg de proteína.

Tabla 8. Composición del inmunógeno empleado por grupo.

Grupo	VME CU385	TbpB rec.	pELIP6	pELI
1		10 µg		
2	5µg	10 µg		
3	5µg			
4	5µg	10 µg	50 µg	
5	5µg	10 µg		50 µg

A los sueros extraídos al final del esquema, se les determinó el título de anticuerpos contra la proteína TbpB recombinante. Además se titularon los sueros para cuantificar los niveles de anticuerpos contra la proteína P6. Dicho antígeno recombinante fue purificado previamente a partir de una cepa de *E. coli* modificada genéticamente.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un análisis de varianza de clasificación simple. En la comparación de las medias de los tratamientos en las combinaciones necesarias se realizó la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls.

La Figura 14 representa gráficamente los resultados del esquema de inmunización, en cuanto a niveles de anticuerpos contra la proteína TbpB recombinante y P6 recombinante, respectivamente. Los mayores títulos de anticuerpos contra la proteína TbpB recombinante se indujeron en las variantes en que la proteína se incorporó al proteoliposoma de una cepa heteróloga. La presencia del plasmidio

pELIP6 en la formulación no afectó la inmunogenicidad de la proteína TbpB recombinante.

Por otra parte, el plasmidio que codifica para P6 produjo una respuesta de anticuerpos al nivel esperado, tras la inmunización con el mismo en presencia del complejo TbpB-VME. Dicha respuesta fue superior (con significación estadística) a la alcanzada por el grupo que poseía una formulación similar, pero que contenía el vector pELI.

10

15

20

REIVINDICACIONES

MÉTODO PARA LA INCORPORACIÓN DE ANTÍGENOS EN VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE BACTERIAS Y FORMULACIONES RESULTANTES.

- 5 1. Método para incorporar antígenos en vesículas de membrana externa de bacterias, caracterizado porque dichos antígenos forman un complejo con una preparación de proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas, siendo este complejo generado por co-renaturalización y manteniendo intacta la estructura vesicular del proteoliposoma.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, donde la preparación de proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas se obtiene a partir de especies de la familia Neisseriaceae o de *Bramhamella catarrhalis*.
3. El método según la reivindicación 2, donde la preparación de proteínas de membrana externa de bacterias es de *Neisseria meningitidis* y de *Neisseria*
15 *lactamica*.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el antígeno proteico es de origen natural, recombinante o sintético.
5. Composición vacunal obtenida según el método de la reivindicación 1, para administración por vía parenteral o mucosal, caracterizada porque comprende
20 un complejo formado por un antígeno proteico y una preparación de proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas, donde este complejo es generado por co-renaturalización y mantiene intacta la estructura vesicular del proteoliposoma, en combinación con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 25 6. Composición vacunal según la reivindicación 5, donde la preparación de proteínas de membrana externa de bacterias Gram negativas se obtiene a partir de especies de la familia Neisseriaceae o de *Bramhamella catarrhalis*.
7. Composición vacunal según la reivindicación 6, donde la preparación de proteínas de membrana externa de bacterias es de *Neisseria meningitidis* y de
30 *Neisseria lactamica*.
8. Composición vacunal según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde el antígeno proteico es de origen natural, recombinante o sintético.
9. Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 7, caracterizada porque comprende además polisacáridos bacterianos.

10. Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 7, caracterizada porque comprende además polisacáridos bacterianos conjugados.
11. Composición vacunal de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 7, caracterizada porque comprende además ácido nucleico como antígeno.
- 5 12. Composición vacunal de acuerdo a las reivindicaciones de la 5 a la 11, para uso profiláctico o terapéutico en humano.

10

15

20

Figura 1.

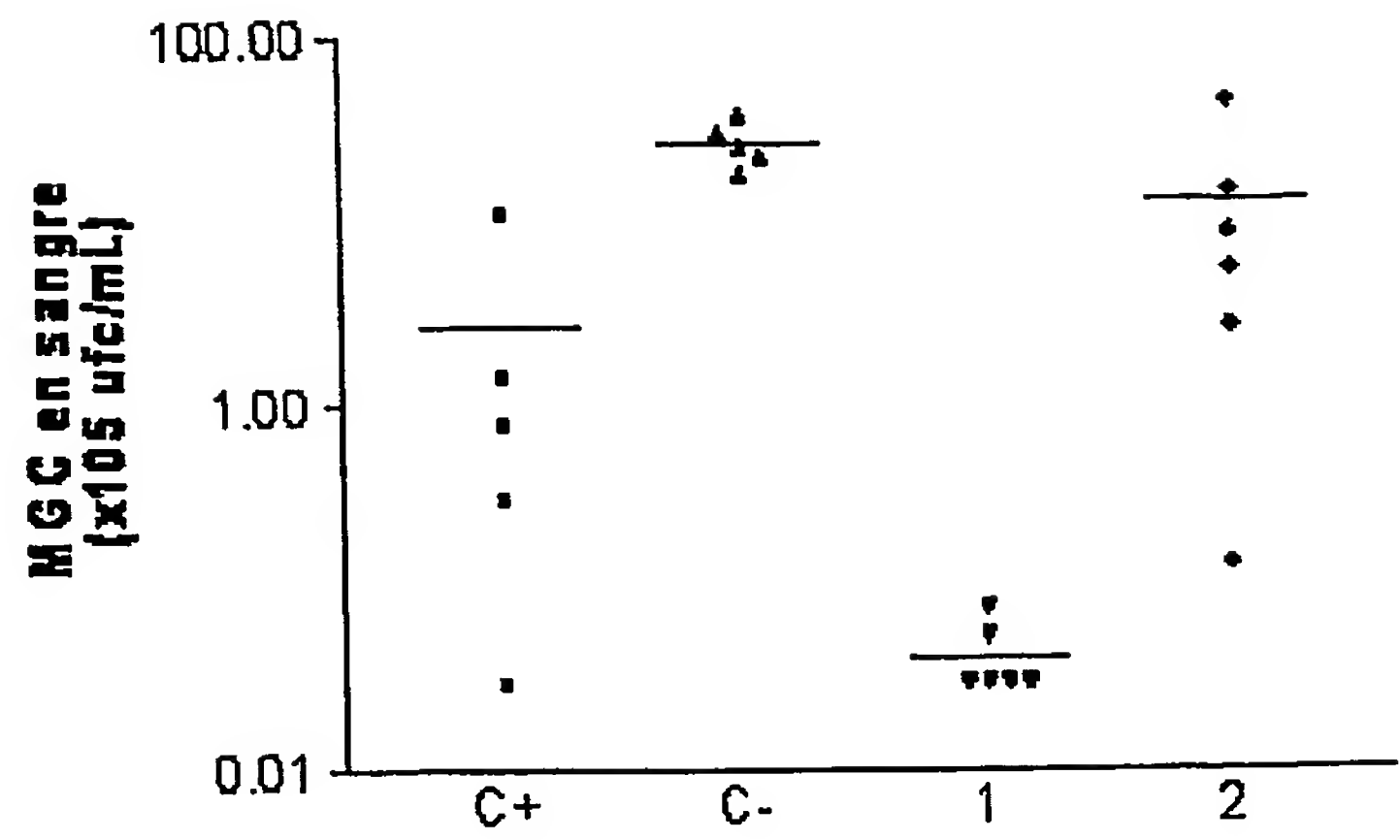


Figura 2.

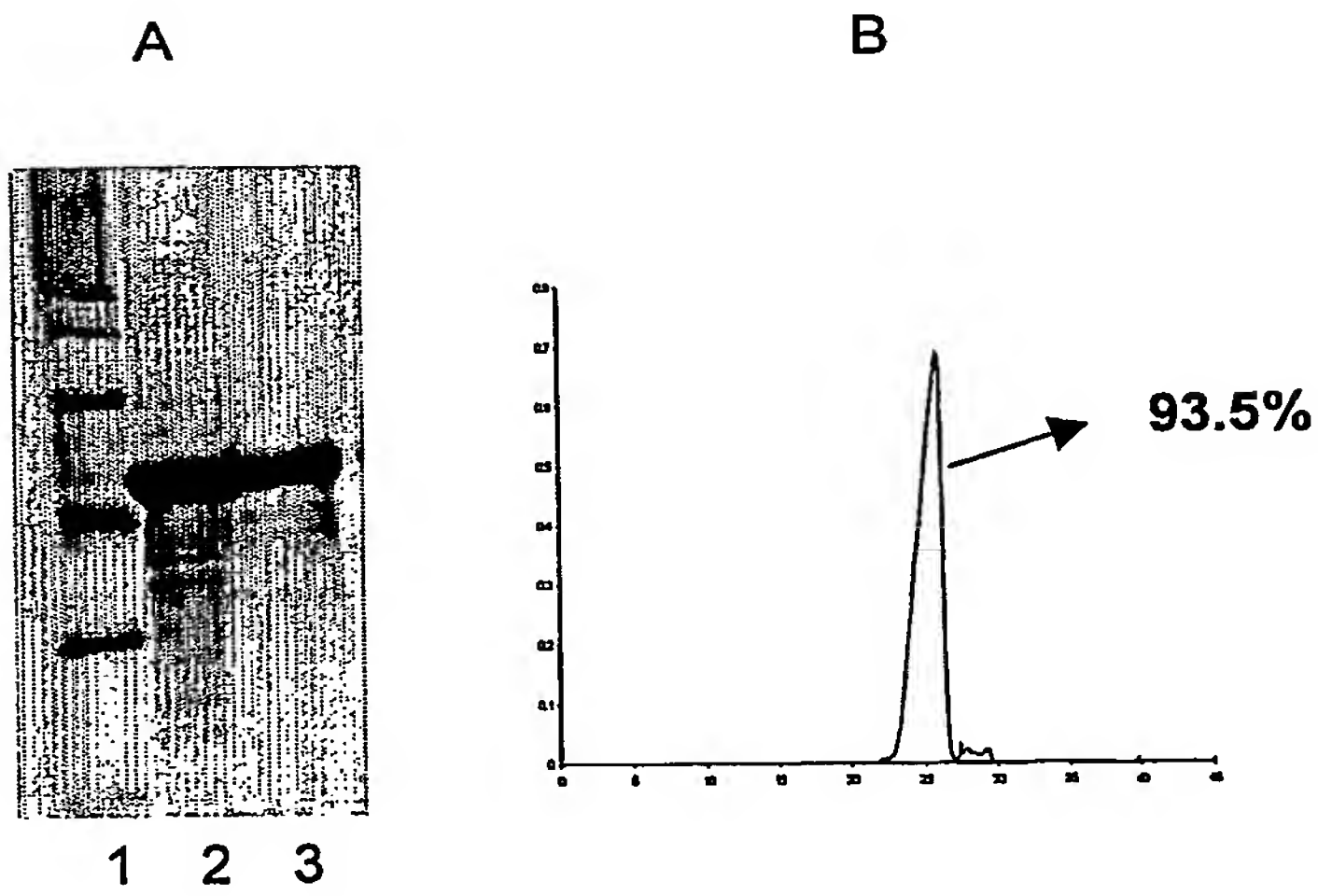


Figura 3.

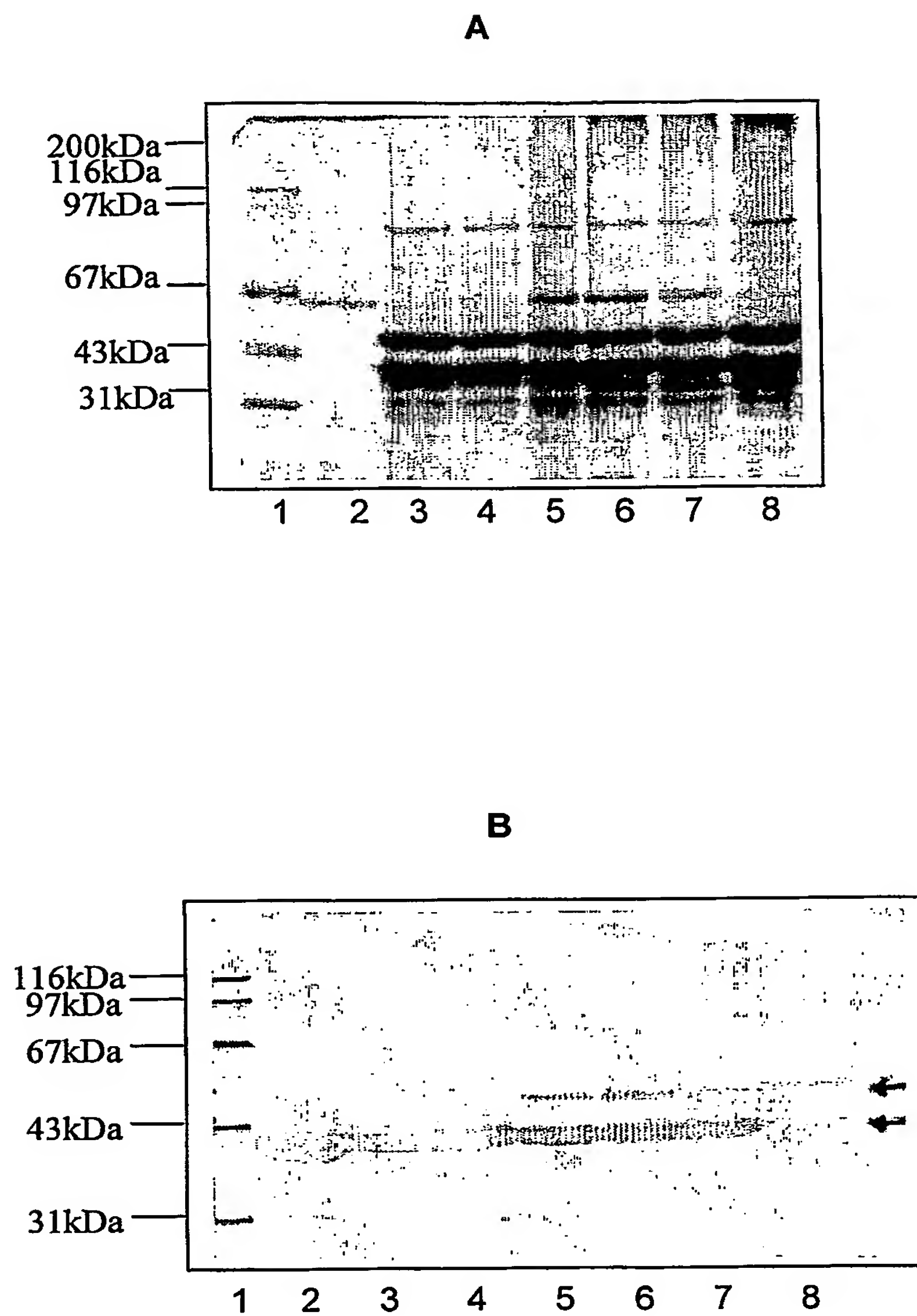


Figura 4.A

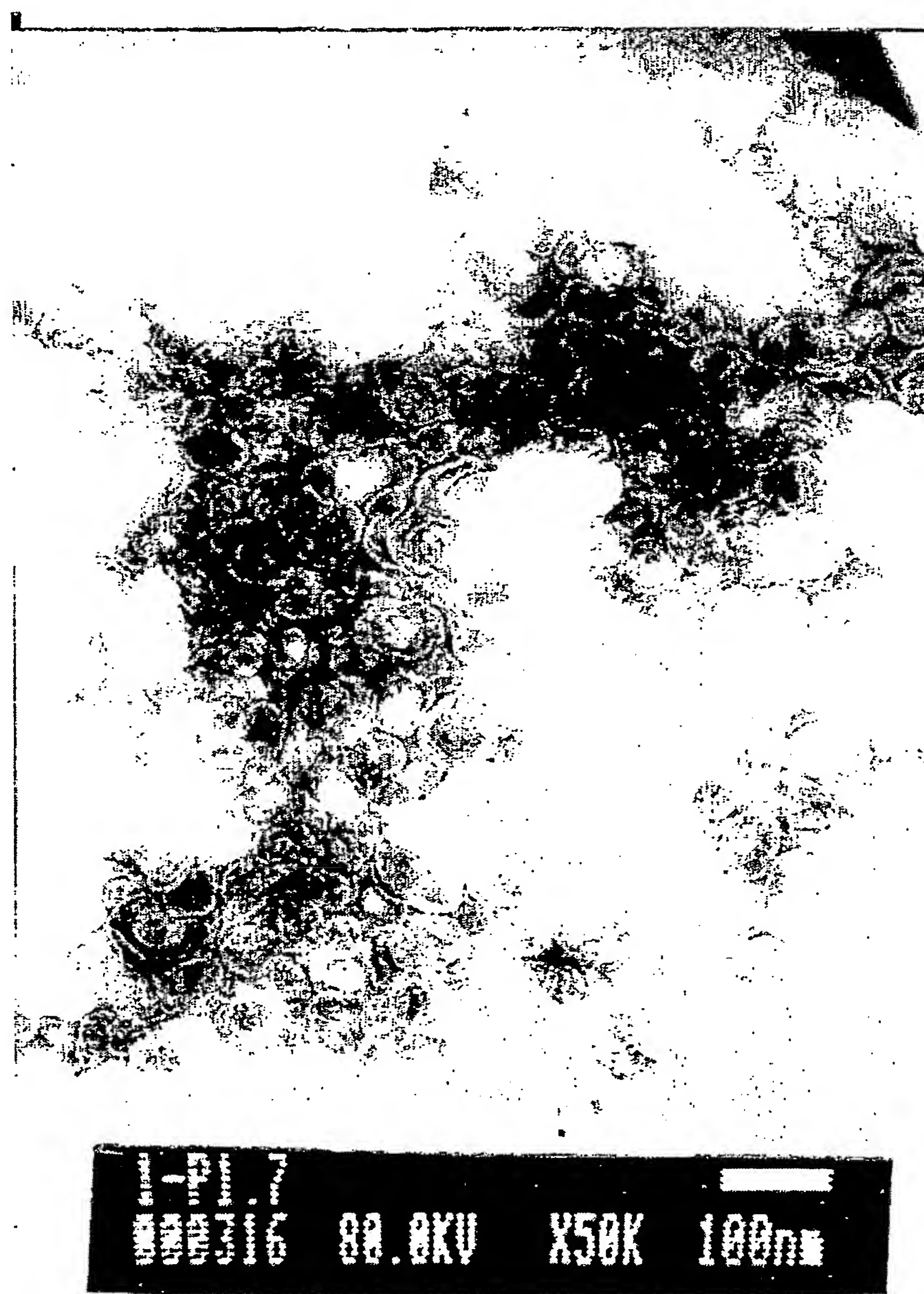
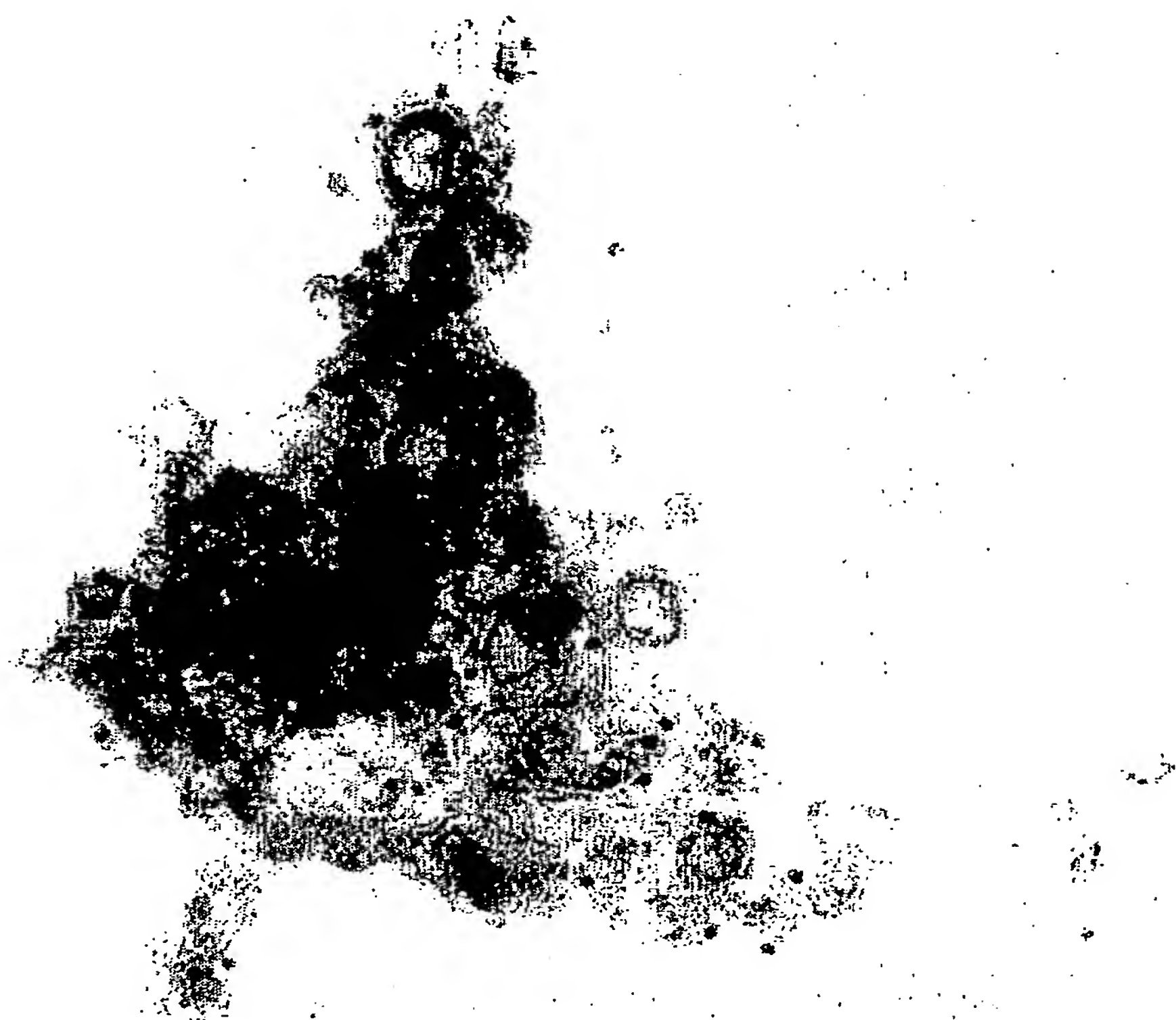


Figura 4.B



Figura 4.C



2-11.16
000324 80.0KV X50K 100nm

Figura 5.

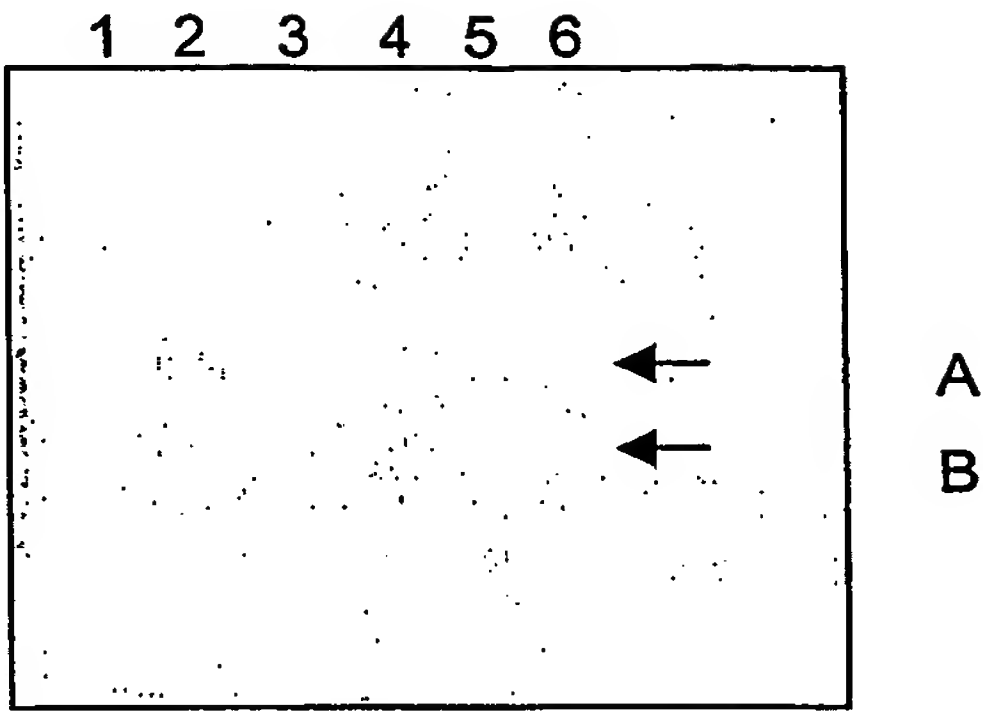


Figura 6.

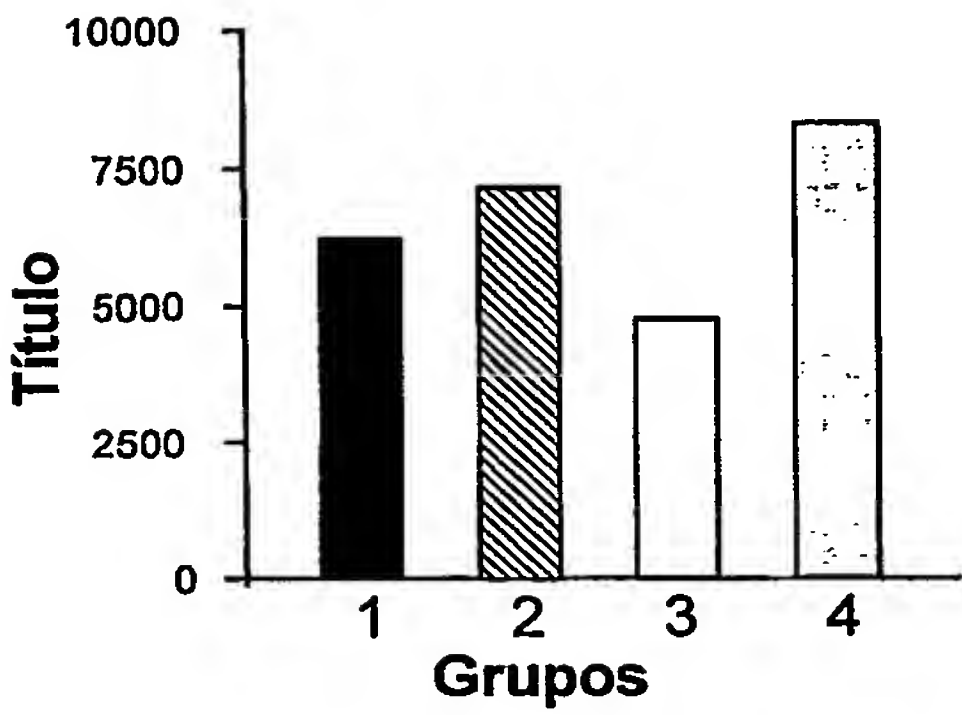


Figura 7.

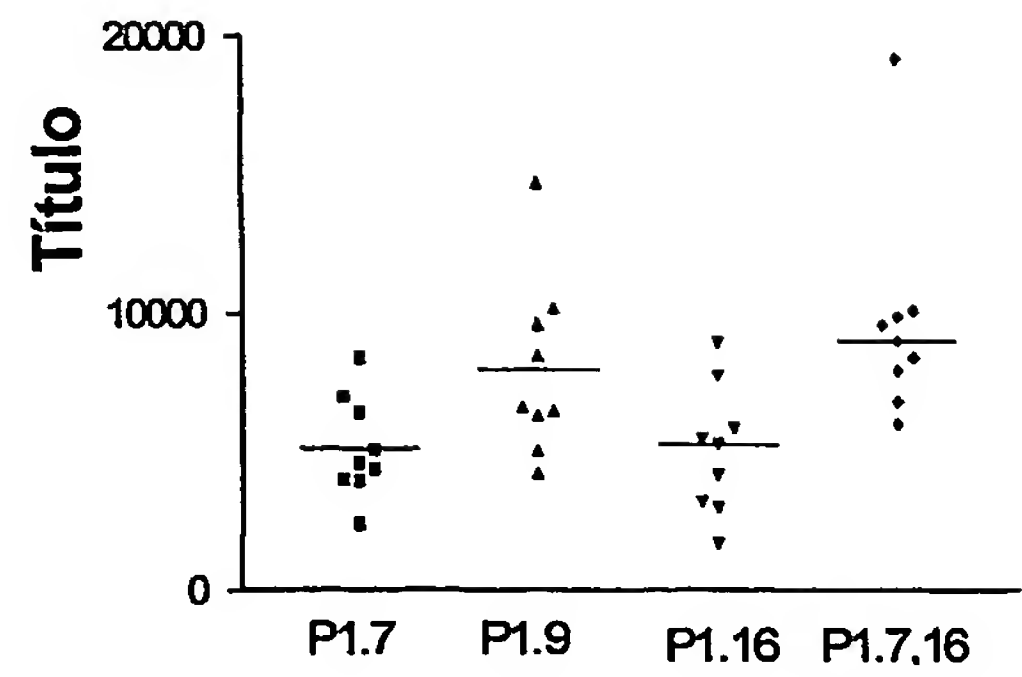


Figura 8.

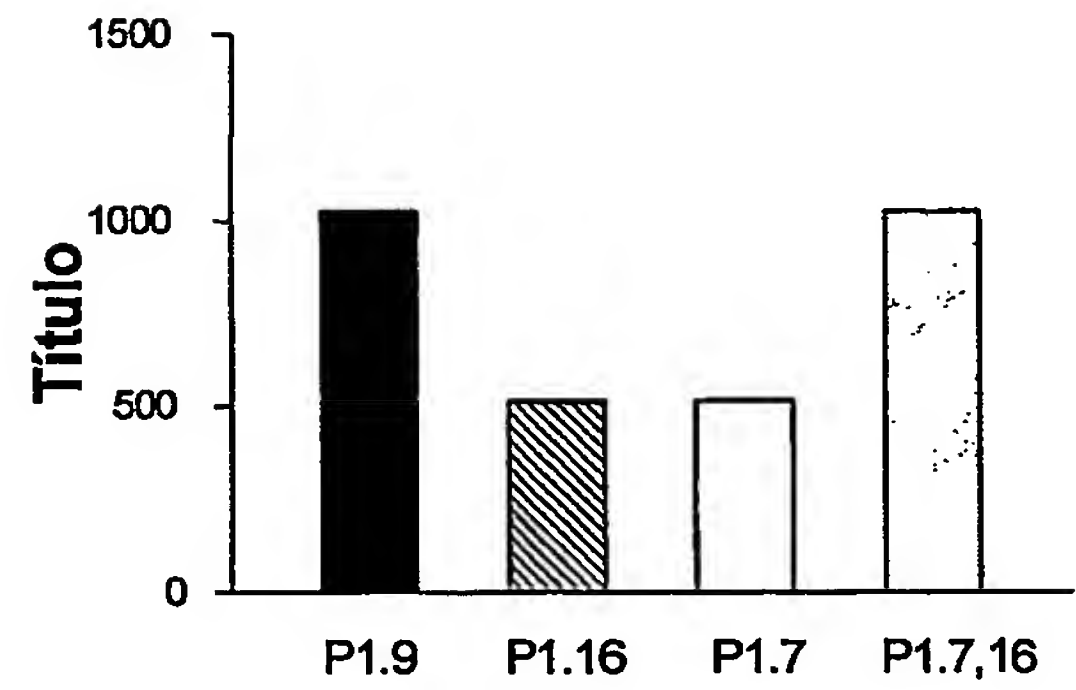


Figura 9.

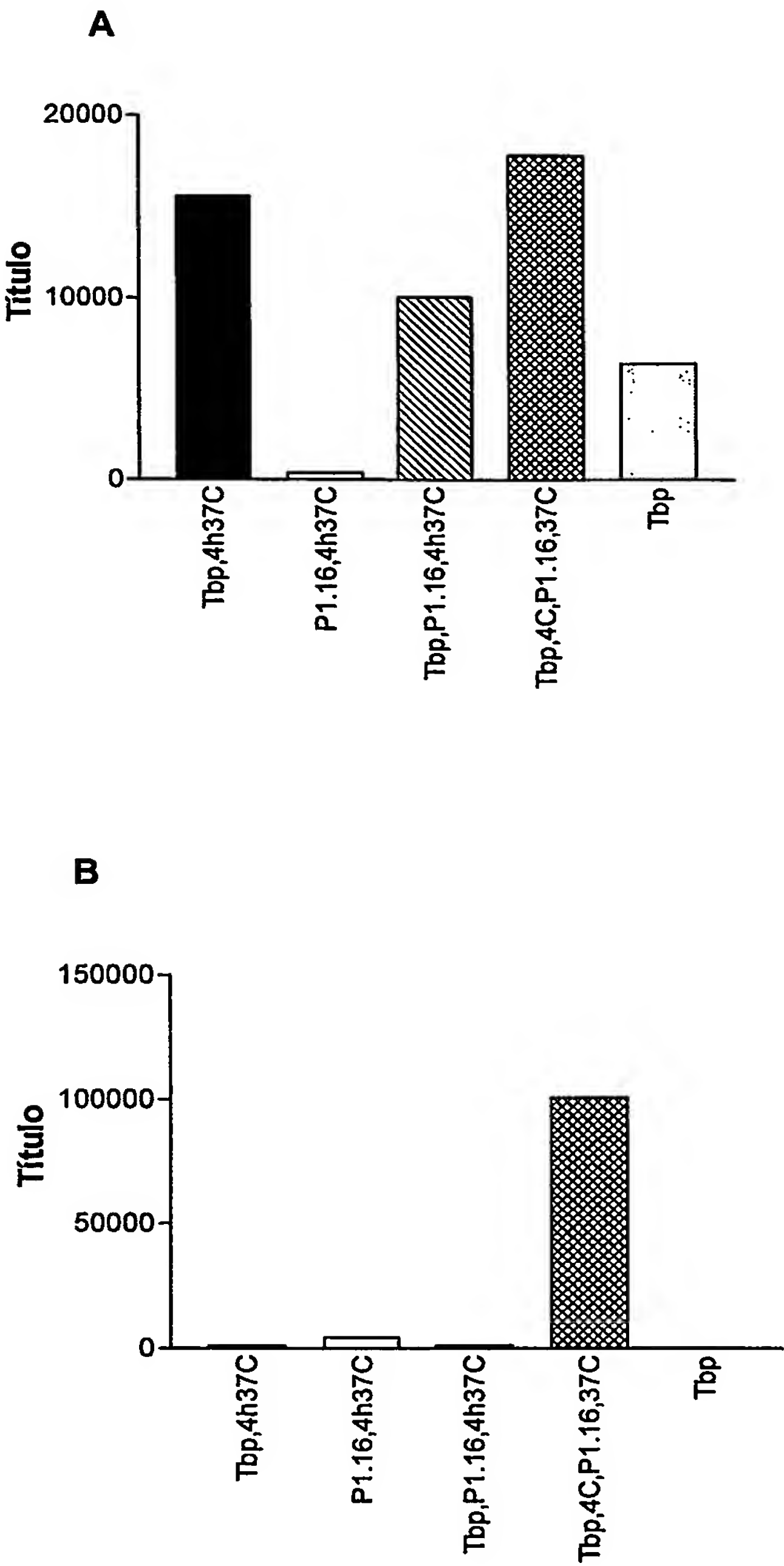


Figura 10.

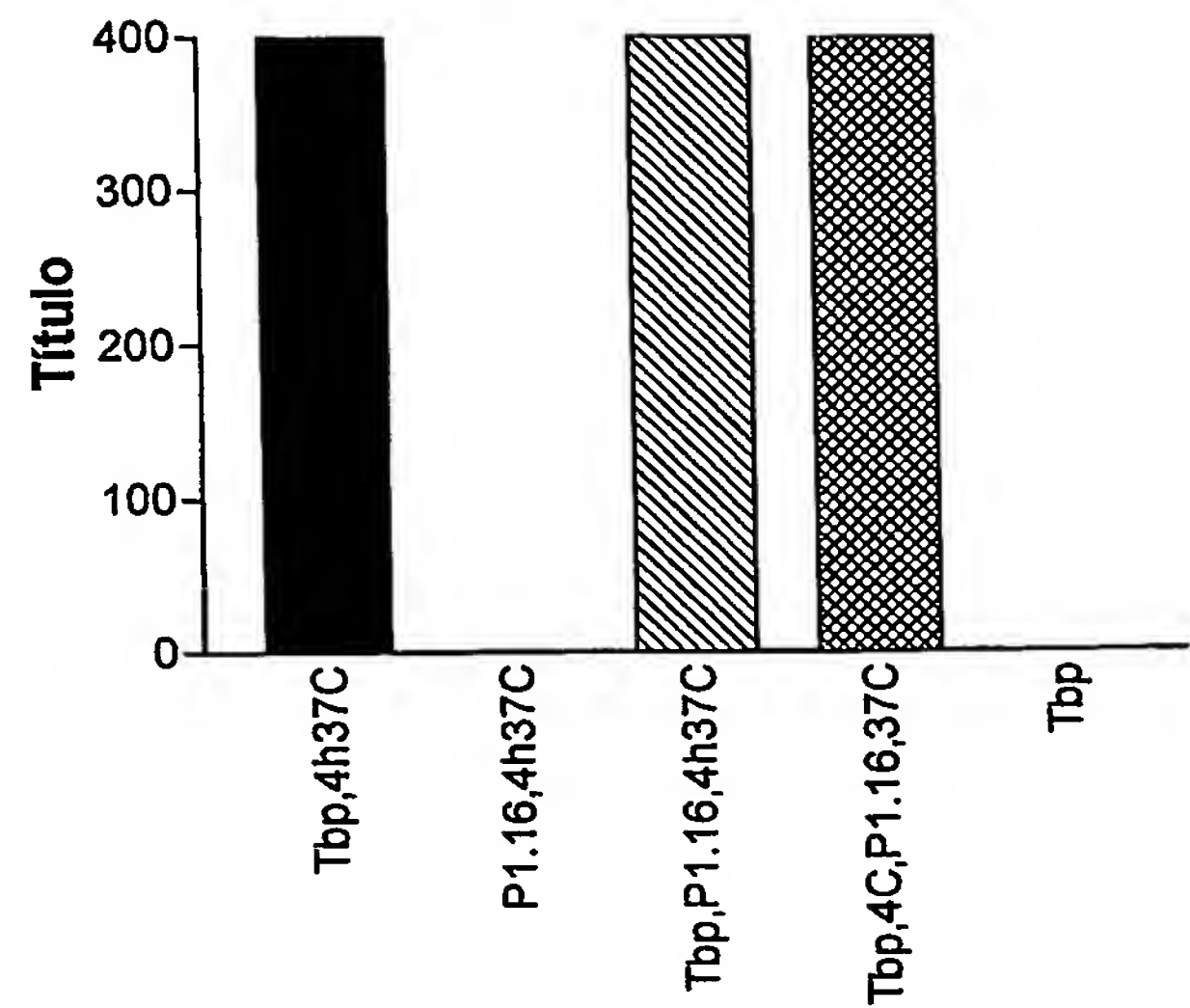


Figura 11.

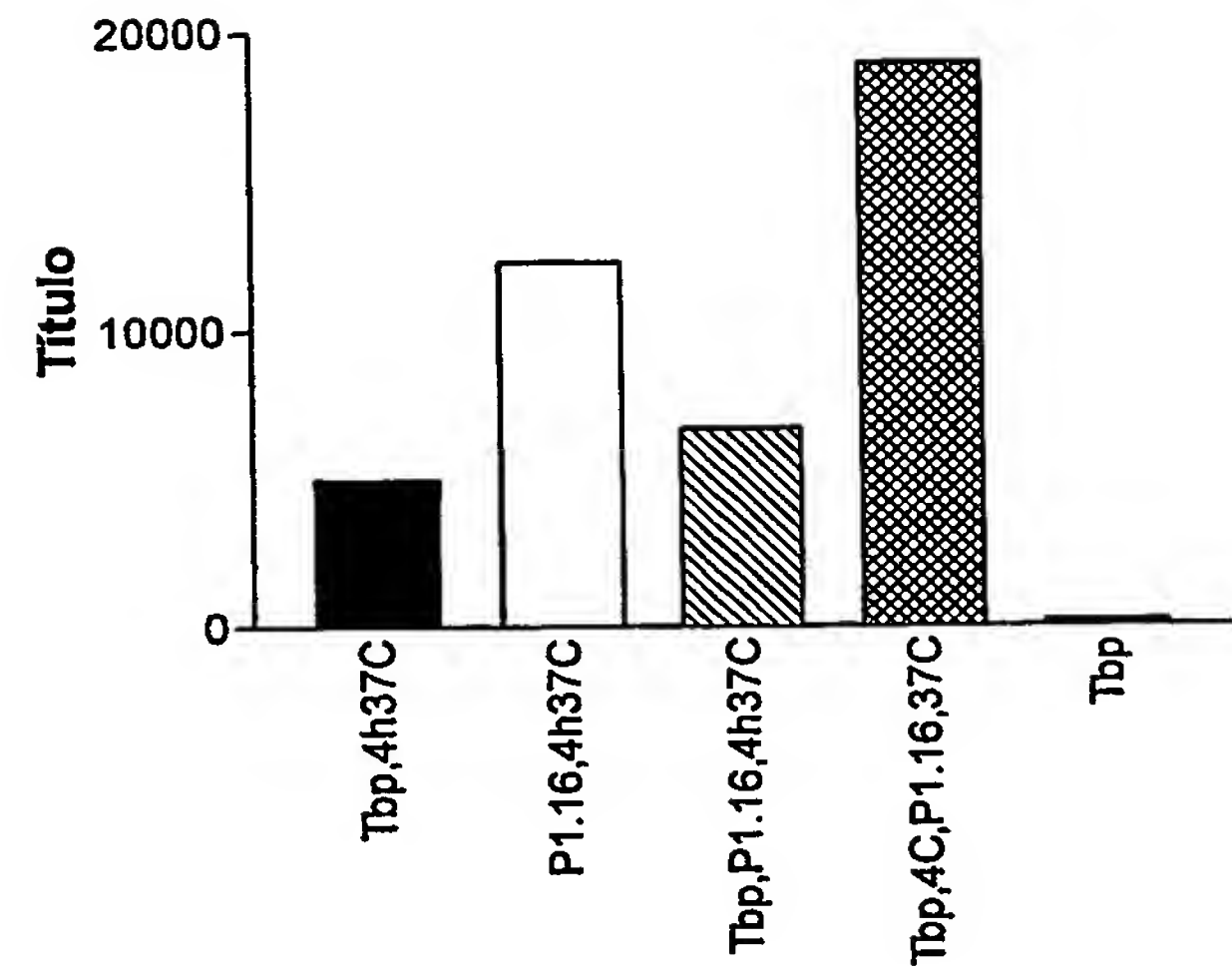


Figura 12.

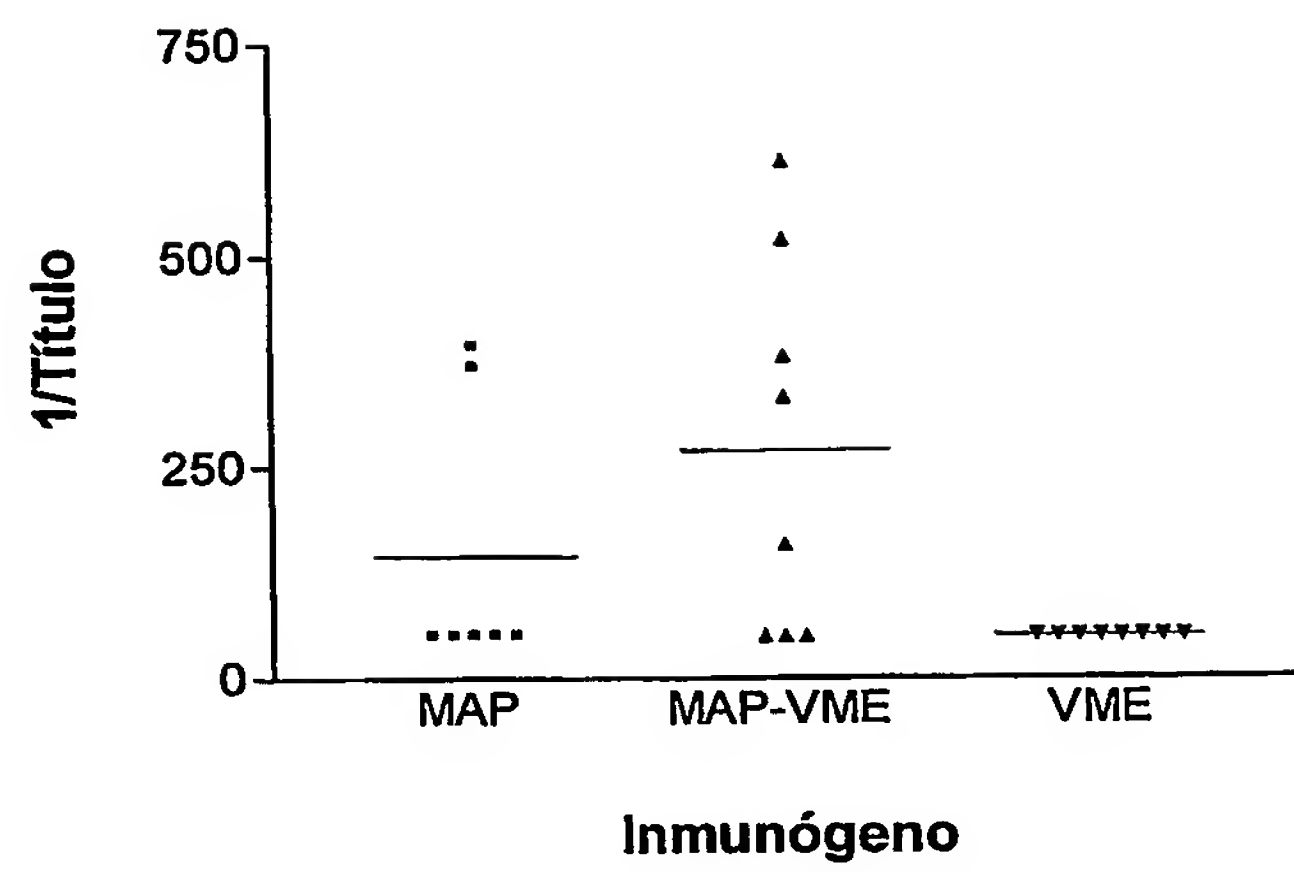


Figura 13.

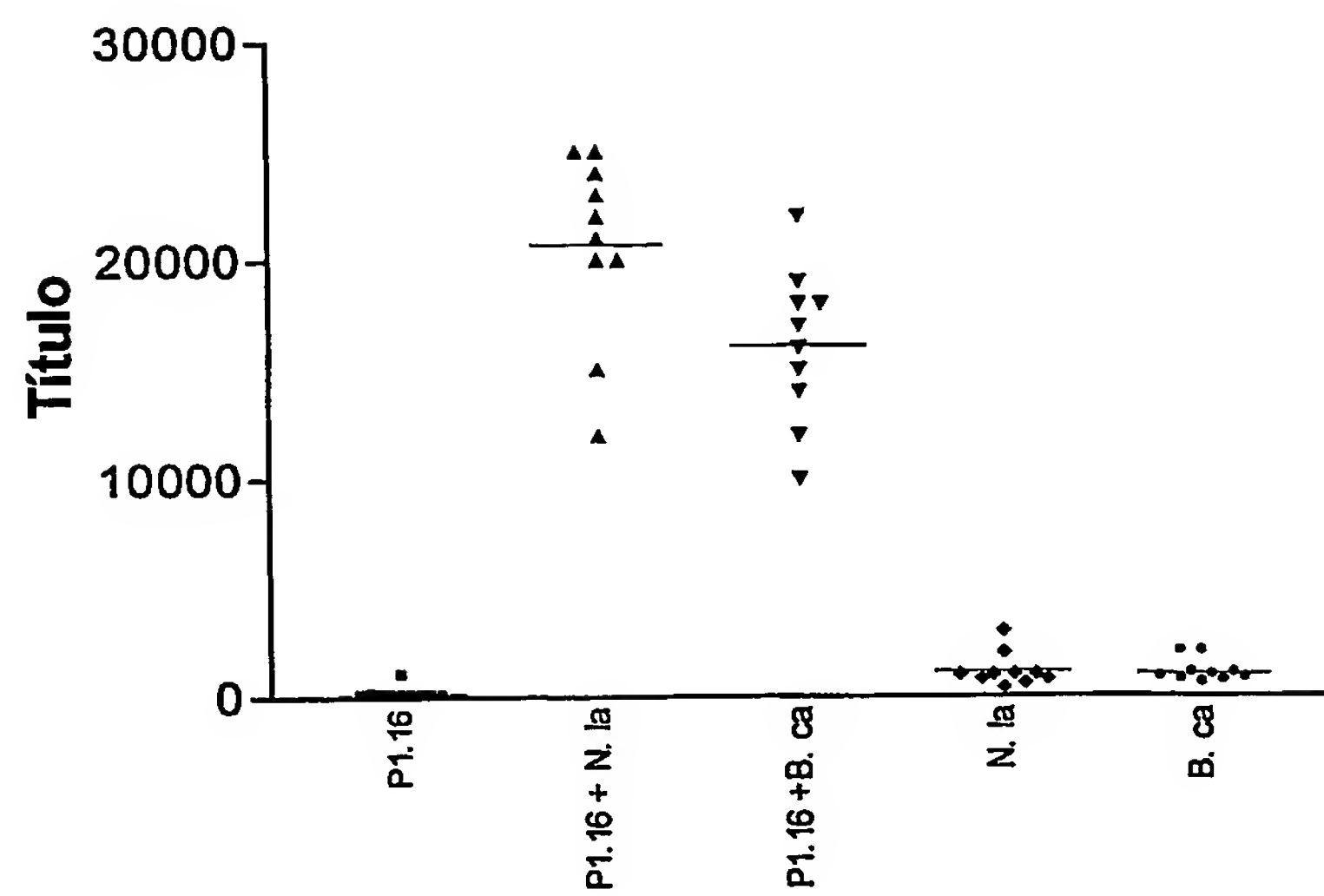
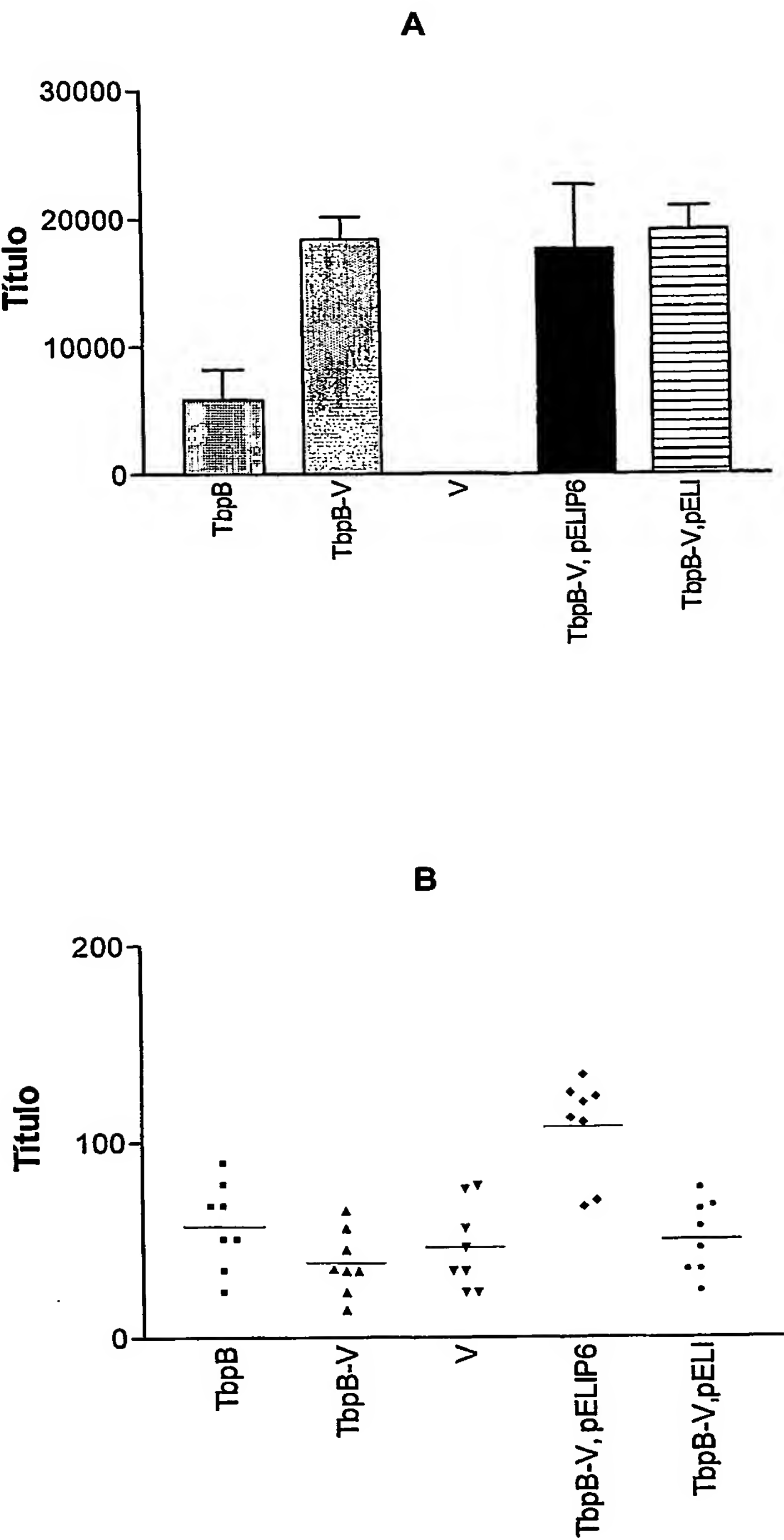


Figura 14.



INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU04/00012

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

CIP7 C07K14/22 A61K39/00

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP7 C07K A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	EP 1 297 844 A2 (HEALTH PROTECTION AGENCY) 2 abril 2003 (2003-04-02)	5-8, 12
Y	todo el documento	9, 10
Y	----- SARDINAS G ET AL: "Anti-PorA antibodies elicited by immunization with peptides conjugated to P64k" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 277, no. 1, 14 octubre 2000 (2000-10-14), paginas 51-54, XP002314670 ISSN: 0006-291X todo el documento	1-12
Y	----- US 2003/059444 A1 (ZOLLINGER WENDELL D ET AL) 27 marz 2003 (2003-03-27) todo el documento	1-12

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

24 enero 2005 (24.04.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

14 febrero 2005 (14.04.2005)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

Facsímil N°

Teléfono N°

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	SAUNDERS NANCY B ET AL: "Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 67, no. 1, enero 1999 (1999-01), paginas 113-119, XP002314671 ISSN: 0019-9567 todo el documento	1-12
Y	WO 03/051379 A1 (HEALTH PROTECTION AGENCY; FOSTER, KEITH, ALAN; GORRINGE, ANDREW, RICHARD) 26 junio 2003 (2003-06-26) todo el documento	1-12
Y	WO 01/91788 A1 (STATENS INSTITUTT FOR FOLKEHELSE; ROSENQVIST, EINAR; HARBAK, KARI; NOR) 6 diciembre 2001 (2001-12-06) todo el documento	1-12
Y	WO 01/09350 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A; BERTHET, FRANCOIS-XAVIER, JACQUES;) 8 febrero 2001 (2001-02-08) todo el documento	1-12
Y	JIN ZHIGANG ET AL: "Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 71, no. 9, septiembre 2003 (2003-09), pages 5115-5120, XP002314672 ISSN: 0019-9567 todo el documento	9, 10
A	WO 00/25811 A2 (MICROBIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY CAMR ; ROBINSON, ANDREW; GORRINGE,) 11 mayo 2000 (2000-05-11) todo el documento	
P,A	WO 2004/019977 A2 (CHIRON SRL; PIZZA, MARIAGRAZIA; SERRUTO, DAVIDE; RAPPUOLI, RINI) 11 marz 2004 (2004-03-11) todo el documento	

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	<p>GUILLEN G ET AL: "Cloning and expression of the porA gene of the Neisseria meningitidis strain B:4:P1.15 in Escherichia coli preliminary characterization of the recombinant polypeptide"</p> <p>ACTA BIOTECHNOLOGICA, vol. 16, no. 2-3, 1996, paginas :165-173, XP002314673 ISSN: 0138-4988 todo el documento</p>	
P,Y	<p>-----</p> <p>CARMENATE TANIA ET AL: "Effect of conjugation methodology on the immunogenicity and protective efficacy of meningococcal group C polysaccharide-P64k protein conjugates"</p> <p>FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 3, 9 abril 2004 (2004-04-09), paginas 193-199, XP002314674 ISSN: 0928-8244 todo el documento</p>	1-12
P,Y	<p>-----</p> <p>HERMIDA LISSET ET AL: "A dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice."</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 115, no. 1, enero 2004 (2004-01), paginas 41-49, XP002314675 ISSN: 0166-0934 todo el documento</p>	1-12

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU04/00012

Documento de patente citado en el informe de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
EP 1297844	A2	02-04-2003	AT	242640 T	15-06-2003
			AU	760858 B2	22-05-2003
			AU	1056900 A	22-05-2000
			BR	9914946 A	10-07-2001
			CA	2349331 A1	11-05-2000
			DE	69908805 D1	17-07-2003
			DE	69908805 T2	19-05-2004
			DK	1126874 T3	29-09-2003
			EP	1126874 A2	29-08-2001
			ES	2197688 T3	01-01-2004
			WO	0025811 A2	11-05-2000
			JP	2002528515 T	03-09-2002
			PT	1126874 T	31-10-2003
			US	2003215469 A1	20-11-2003
			US	6821521 B1	23-11-2004
<hr/>					
US 2003059444	A1	27-03-2003	NINGUNO		
<hr/>					
WO 03051379	A1	26-06-2003	CA	2464512 A1	26-06-2003
			EP	1476173 A1	17-11-2004
<hr/>					
WO 0191788	A1	06-12-2001	AU	6442701 A	11-12-2001
			CA	2410652 A1	06-12-2001
			EP	1286696 A1	05-03-2003
			US	2004131642 A1	08-07-2004
<hr/>					
WO 0109350	A2	08-02-2001	AU	770360 B2	19-02-2004
			AU	6833600 A	19-02-2001
			BR	0012974 A	07-05-2002
			CA	2380840 A1	08-02-2001
			CN	1377415 T	30-10-2002
			CZ	20020403 A3	15-05-2002
			EP	1208214 A2	29-05-2002
			HU	0203056 A2	28-12-2002
			JP	2003506049 T	18-02-2003
			MX	PA02001205 A	02-07-2002
			NO	20020506 A	02-04-2002
			PL	353891 A1	15-12-2003
			TR	200200275 T2	21-05-2002
			TR	200202448 T2	21-01-2003
			ZA	200200824 A	22-09-2003
<hr/>					
WO 0025811	A2	11-05-2000	AT	242640 T	15-06-2003
			AU	760858 B2	22-05-2003
			AU	1056900 A	22-05-2000
			BR	9914946 A	10-07-2001
			CA	2349331 A1	11-05-2000
			DE	69908805 D1	17-07-2003
			DE	69908805 T2	19-05-2004
			DK	1126874 T3	29-09-2003
			EP	1297844 A2	02-04-2003
			EP	1126874 A2	29-08-2001
			ES	2197688 T3	01-01-2004
			JP	2002528515 T	03-09-2002
			PT	1126874 T	31-10-2003
			US	2003215469 A1	20-11-2003
			US	6821521 B1	23-11-2004

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°
PCT/CU04/00012

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2004019977	A2	11-03-2004	NINGUNO

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC77CU2004/000012A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/22 A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 297 844 A2 (HEALTH PROTECTION AGENCY) 2 April 2003 (2003-04-02)	5-8, 12
Y	the whole document	9, 10
Y	----- SARDINAS G ET AL: "Anti-PorA antibodies elicited by immunization with peptides conjugated to P64k" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 277, no. 1, 14 October 2000 (2000-10-14), pages 51-54, XP002314670 ISSN: 0006-291X the whole document	1-12
Y	----- US 2003/059444 A1 (ZOLLINGER WENDELL D ET AL) 27 March 2003 (2003-03-27) the whole document ----- -/-	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2005

Date of mailing of the international search report

14/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hix, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CU2004/000012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAUNDERS NANCY B ET AL: "Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 67, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 113-119, XP002314671 ISSN: 0019-9567 the whole document -----	1-12
Y	WO 03/051379 A1 (HEALTH PROTECTION AGENCY; FOSTER, KEITH, ALAN; GORRINGE, ANDREW, RICHA) 26 June 2003 (2003-06-26) the whole document -----	1-12
Y	WO 01/91788 A1 (STATENS INSTITUTT FOR FOLKEHELSE; ROSENQVIST, EINAR; HARBAK, KARI; NOR) 6 December 2001 (2001-12-06) the whole document -----	1-12
Y	WO 01/09350 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A; BERTHET, FRANCOIS-XAVIER, JACQUES;) 8 February 2001 (2001-02-08) the whole document -----	1-12
Y	JIN ZHIGANG ET AL: "Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 71, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 5115-5120, XP002314672 ISSN: 0019-9567 the whole document -----	9, 10
A	WO 00/25811 A2 (MICROBIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY CAMR ; ROBINSON, ANDREW; GORRINGE,) 11 May 2000 (2000-05-11) the whole document -----	
P,A	WO 2004/019977 A2 (CHIRON SRL; PIZZA, MARIAGRAZIA; SERRUTO, DAVIDE; RAPPUOLI, RINI) 11 March 2004 (2004-03-11) the whole document -----	
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/ CU2004/000012

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GUILLEN G ET AL: "Cloning and expression of the porA gene of the Neisseria meningitidis strain B:4:P1.15 in Escherichia coli preliminary characterization of the recombinant polypeptide" ACTA BIOTECHNOLOGICA, vol. 16, no. 2-3, 1996, pages 165-173, XP002314673 ISSN: 0138-4988 the whole document</p>	
P,Y	<p>----- CARMENATE TANIA ET AL: "Effect of conjugation methodology on the immunogenicity and protective efficacy of meningococcal group C polysaccharide-P64k protein conjugates" FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 3, 9 April 2004 (2004-04-09), pages 193-199, XP002314674 ISSN: 0928-8244 the whole document</p>	1-12
P,Y	<p>----- HERMIDA LISSET ET AL: "A dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice." JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 115, no. 1, January 2004 (2004-01), pages 41-49, XP002314675 ISSN: 0166-0934 the whole document</p>	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CU2004/000012

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☐

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

In written format

☐

In computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2.

☐

In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3.

Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CA2004/000012

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1297844	A2	02-04-2003	AT 242640 T AU 760858 B2 AU 1056900 A BR 9914946 A CA 2349331 A1 DE 69908805 D1 DE 69908805 T2 DK 1126874 T3 EP 1126874 A2 ES 2197688 T3 WO 0025811 A2 JP 2002528515 T PT 1126874 T US 2003215469 A1 US 6821521 B1	15-06-2003 22-05-2003 22-05-2000 10-07-2001 11-05-2000 17-07-2003 19-05-2004 29-09-2003 29-08-2001 01-01-2004 11-05-2000 03-09-2002 31-10-2003 20-11-2003 23-11-2004
US 2003059444	A1	27-03-2003	NONE	
WO 03051379	A1	26-06-2003	CA 2464512 A1 EP 1476173 A1	26-06-2003 17-11-2004
WO 0191788	A1	06-12-2001	AU 6442701 A CA 2410652 A1 EP 1286696 A1 US 2004131642 A1	11-12-2001 06-12-2001 05-03-2003 08-07-2004
WO 0109350	A2	08-02-2001	AU 770360 B2 AU 6833600 A BR 0012974 A CA 2380840 A1 CN 1377415 T CZ 20020403 A3 EP 1208214 A2 HU 0203056 A2 JP 2003506049 T MX PA02001205 A NO 20020506 A PL 353891 A1 TR 200200275 T2 TR 200202448 T2 ZA 200200824 A	19-02-2004 19-02-2001 07-05-2002 08-02-2001 30-10-2002 15-05-2002 29-05-2002 28-12-2002 18-02-2003 02-07-2002 02-04-2002 15-12-2003 21-05-2002 21-01-2003 22-09-2003
WO 0025811	A2	11-05-2000	AT 242640 T AU 760858 B2 AU 1056900 A BR 9914946 A CA 2349331 A1 DE 69908805 D1 DE 69908805 T2 DK 1126874 T3 EP 1297844 A2 EP 1126874 A2 ES 2197688 T3 JP 2002528515 T PT 1126874 T US 2003215469 A1 US 6821521 B1	15-06-2003 22-05-2003 22-05-2000 10-07-2001 11-05-2000 17-07-2003 19-05-2004 29-09-2003 02-04-2003 29-08-2001 01-01-2004 03-09-2002 31-10-2003 20-11-2003 23-11-2004

International Application No
PCY/CU2004/000012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)